

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 54, No 2 (2003)



### Yeasts as a causative agent of bovine mastitis in Greece

*E. BOURTZI-HATZOPOULOU (Ε. ΜΠΟΥΡΤΖΗ-ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ), A. ZDRAGAS (Α. ΖΔΡΑΓΚΑΣ), E. PETRIDOU (Ε. ΠΕΤΡΙΔΟΥ), G. FILIOUSIS (Γ. ΦΙΛΙΟΥΣΗΣ)*

doi: [10.12681/jhvms.15257](https://doi.org/10.12681/jhvms.15257)

#### To cite this article:

BOURTZI-HATZOPOULOU (Ε. ΜΠΟΥΡΤΖΗ-ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ) Ε., ZDRAGAS (Α. ΖΔΡΑΓΚΑΣ) Α., PETRIDOU (Ε. ΠΕΤΡΙΔΟΥ) Ε., & FILIOUSIS (Γ. ΦΙΛΙΟΥΣΗΣ) Γ. (2018). Yeasts as a causative agent of bovine mastitis in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 54(2), 105–110. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15257>

## Ζυμομύκητες ως αιτιολογικός παράγοντας μαστίτιδας αγελάδων στην Ελλάδα

Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου<sup>1</sup>, Α. Ζδράγκας<sup>2</sup>,  
Ε. Πετρίδου<sup>1</sup>, Γ. Φιλίουσης<sup>1</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Σκοπός της έρευνας ήταν η διερεύνηση της μυκητιακής μαστίτιδας των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων με απομόνωση και ταυτοποίηση των υπεύθυνων μυκήτων. Εξετάστηκαν 608 δείγματα γάλακτος προερχόμενα από ιοάριθμα τεταρτημόρια 580 αγελάδων με συμπτώματα κλινικής μαστίτιδας από τη Βόρειο Ελλάδα κατά τη διάρκεια των ετών 1997-2001. Στο 50% των ζώων είχε χορηγηθεί αντιβακτηριακή αγωγή χωρίς να προηγηθεί απομόνωση ή/και δοκιμή ευαισθησίας του αιτιολογικού παράγοντα. Απομονώθηκαν 42 μύκητες οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με τις γνωστές μυκητολογικές μεθόδους. Από αυτούς, οι 38 (90,4%) ήταν ζυμομύκητες και οι 4 (9,6%) μυκητολλιακοί μύκητες. Οι ζυμομύκητες που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν στα γένη *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*. Από τα 34 στελέχη του γένους *Candida* βρέθηκε ότι 14 ήταν *C. tropicalis*, και 6 *C. krusei*. Επίσης, 4 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *C. pseudotropicalis*, 4 ως *C. albicans*, 3 ως *C. parapsilosis* και 3 ως *C. rugosa* ενώ 2 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Geotrichum candidum* και 2 ως *Rhodotorula* spp. Οι μυκητολλιακοί μύκητες που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως *Aspergillus* spp. Μύκητες απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια από 38 δείγματα γάλακτος και σε μικτή μαζί με βακτήρια από 4 δείγματα. Από 510 δείγματα απομονώθηκαν μόνο βακτήρια, ενώ από 56 δεν απομονώθηκε κανένας μικροοργανισμός. Είναι προφανές ότι οι ζυμομύκητες εμπλέκονται στην παθογένεια της μαστίτιδας και προκαλούν οικονομικές απώλειες.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** Αγελάδες, μαστίτιδες, ζυμομύκητες, *Candida* spp.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μαστίτιδες αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των εκτροφών αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, στο οποίο εμπλέκεται ένα σύνολο παθογόνων παραγόντων. Οι ζυμομύκητες αποτελούν μέρος της φυσιολογι-

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 541 24, Θεσσαλονίκη

<sup>2</sup>Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικών Ερευνών, 26ης Οκτωβρίου 80, 54 6 27, Θεσσαλονίκη.

## Yeasts as a causative agent of bovine mastitis in Greece

Bourtzi-Hatzopoulou E.<sup>1</sup>, Zdragas A.<sup>2</sup>,  
Petridou E.<sup>1</sup>, Filiouisis G.<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** The aim of this study was to isolate fungi from mastitic milk of dairy cows and to identify fungal microorganisms involved in bovine mastitis. A total of 608 milk samples from clinical mastitis quarters from 580 animals in Northern Greece were collected, during the years 1997-2001. Antibacterial treatment was administered to 50% of the sampled animals. Forty two (42) fungi were isolated and identified using mycological media and methods. From the 42 fungi isolates, 38 were yeasts and 4 moulds. The yeasts isolated were classified into the genera *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*. From the thirty four (34) *Candida* species, 14 were identified as *C. tropicalis* and 6 as *C. krusei*. Furthermore, 4 isolates were classified as *C. pseudotropicalis*, 4 as *C. albicans*, 3 as *C. parapsilosis* and 3 as *C. rugosa*. *Geotrichum candidum* and *Rhodotorula* spp. were represented with 2 isolates. The isolated moulds were classified into the genus *Aspergillus*. Fungi were isolated in pure culture from 38 milk samples and in mixed culture with bacteria from 4. In 510 samples only bacteria were cultured, while in 56 samples no growth of microorganism was observed. The results of the present study indicate that a level of 6.9% of mycotic mastitis is significant and yeasts are apparently implicated in mammary gland pathology causing economic loss.

**Key words:** Bovine mycotic mastitis, yeast, *Candida* spp.

### INTRODUCTION

Mastitis is one of the most important diseases in dairy cows. A variety of pathogenic microorganisms is involved. Yeasts are normal inhabitants of the skin of the udder and the teats where they exist in low numbers and most of them

<sup>1</sup> Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, 54 124 GREECE,

<sup>2</sup>NAGREF, Thessaloniki, 54 627, GREECE

κής χλωρίδας του μαστού και της θηλής, όπου βρίσκονται σε περιορισμένο αριθμό και οι περισσότεροι από αυτούς είναι ευκαιριακά παθογόνοι. (Loftsgard και Lindquist, 1960, Topolka, 1968). Τα τελευταία χρόνια όλο και πιο συχνά οι μικροοργανισμοί αυτοί ενοχοποιούνται ως αιτιολογικοί παράγοντες κλινικής και υποκλινικής μαστίτιδας στις αγελάδες (Chengapa και συν 1984, Kirk και Bartlett 1986, Keller και συν 2000).

Πολλές φορές η πηγή μόλυνσης είναι άγνωστη. Το νερό, η στρωμένη, η τροφή, το έδαφος, η αμελκτική μηχανή και τα χέρια του αμελκτή μπορεί να αποτελέσουν πηγές μόλυνσης (Richard και συν. 1980). Άλλη πηγή μόλυνσης μπορεί να αποτελέσουν μολυσμένα με ζυμομυκήτες ενδομαστικά αντιβακτηριακά σκευάσματα, τα οποία χορηγούνται για τη θεραπεία βακτηριακής αιτιολογίας μαστίτιδας ή για προληπτικούς λόγους κατά την ξηρά περίοδο. Επιπλέον, η αναστολή των εκκρίσεων του μαστού, κατά την περίοδο αυτή, εμποδίζει την αποβολή των ζυμομυκήτων, ευνοεί τον αποικισμό του και την εκδήλωση μαστίτιδας (Weigt 1970, Fransworth και Sorensen 1975, Sipka και Petrovic 1975, Fransworth 1977). Η υπερδοσία αντιβακτηριακών τέλος, κατά τη θεραπευτική αγωγή μαστίτιδας, καθώς και ο τραυματισμός της θηλής από την αμελκτική μηχανή ή τη χρήση ενδομαστικών σκευασμάτων, μπορεί να αποτελέσουν σοβαρούς προδιαθεσικούς παράγοντες. Εξάλλου, όλο και περισσότερα περιστατικά μυκητιακής αιτιολογίας μαστίτιδας αναφέρεται ότι σχετίζονται με προηγούμενη χρήση αντιβακτηριακών ουσιών (Prasad και Prasad 1966, Fransworth 1977, Richard και συν. 1980).

Η πλειονότητα των ζυμομυκήτων που έχουν απομονωθεί από περιστατικά μαστίτιδας ανήκουν στο γένος *Candida* (Loftsgard και Lindquist, 1960, Topolka, 1968, Sipka και Petrovic, 1975, Fransworth, 1977). Η *Candida* spp. είναι πιθανό να προκαλέσει κλινική ή/και υποκλινική μαστίτιδα με σοβαρή μείωση της ποσότητας του παραγόμενου γάλακτος. Τα ζώα μπορεί να εμφανίσουν και γενικά συμπτώματα, ενώ τα προσβλημένα τεταρτημόρια φλεγμαίνουν, είναι σκληρά και επώδυνα. Οι εκκρίσεις είναι συνήθως γκριζωπές και περιέχουν πήγματα. Στις αγελάδες συχνά παρατηρείται αυτοίωση, ωστόσο, ορισμένα μολυσμένα τεταρτημόρια μπορεί να συνεχίσουν να απεκκρίνουν το μικροοργανισμό ακόμη και για 6-12 μήνες μετά την αποδρομή των συμπτωμάτων (Prasad και Prasad 1966, Fransworth 1977).

Οι Chermette και Bussieras (1993), μετά από μία βιβλιογραφική ανασκόπηση, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες πάνω από το 6% της μαστίτιδας οφείλεται σε ζυμομυκήτες. Σε ορισμένες μάλιστα εκτροφές το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε 26% (Hofmann και συν. 1965, Lagneau και συν. 1996). Στις ΗΠΑ τα ποσοστά της μυκητιακής αιτιολογίας μαστίτιδας ποικίλουν και κυμαίνονται από 1-4% των υποκλινικών και 2-7% των κλινικών μορφών (Fransworth, 1977, Richard και συν. 1980, Kirk και Bartlett 1986).

Η εργαστηριακή διάγνωση των μυκητιακής αιτιολογίας

are occasionally pathogens. (Loftsgard and Lindquist 1960, Topolka 1968). In recent years, yeasts have been frequently implicated as a causative agent of subclinical and clinical mastitis in dairy animals (Chehgapa et al. 1984, Kirk and Bartlett 1986, Keller et al. 2000).

The natural source of the yeasts in many instances is unknown. Water, floor, straw, feed, soil, milking machine and milker's hands may be a possible source of infection (Richard et al. 1980). Another source of infection could be a yeast-contaminated antibiotic for intramammary use, used either for bacterial infection treatment or preventively during the non lactating period. The lack of secretion removal during this period allows yeasts to colonize the gland more easily (Weigt 1970, Fransworth and Sorensen 1975, Sipka and Petrovic 1975, Fransworth 1977). Moreover, the overdose use of antibiotics in the treatment of mastitis, as well as the teat trauma due to the milking machine or the intramammary substances, are the most important predisposing factors. Furthermore, there is an increasing number of cases reported, almost associated with prior treatment of bacterial mastitis (Prasad and Prasad 1966, Fransworth 1977, Richard et al. 1980).

The majority of yeasts isolates from mastitic milk belonged to genus *Candida* (Loftsgard and Lindquist 1960, Topolka 1968, Sipka and Petrovic 1975, Fransworth 1977). *Candida* spp. may cause subclinical or/and clinical mastitis with severe decrease in milk production. The animals may often show clinical signs of systemic disturbances and the affected quarters are usually inflamed, hard and painful. The secretions are grayish-white and contain numerous flakes. Spontaneous elimination of infection by the cow occurs frequently, although some glands will continue to secrete yeasts for 6 to 12 months (Prasad and Prasad 1966, Fransworth 1977).

Chermette and Bussieras (1993), after an overview of the literature, concluded that in some European countries more than 6% of mastitis is due to yeasts. This percentage in some farm cases is up to 26% (Hofmann et al. 1965, Lagneau et al. 1996). In the United States, the prevalence of fungal mastitis varied. Yeasts cause 1-4% of subclinical mastitis and 2-7% of clinical mastitis (Fransworth 1977, Richard et al. 1980, Kirk and Bartlett 1986).

Selective media are required for the fungi isolation from mastitic milk.

As there is a lack of data, concerning bovine mycotic mastitis in Greece, the purpose of this study was to investigate the incidence of yeasts in the milk of dairy cows and to identify the different genera and species of yeasts involved in bovine mycotic mastitis.

## MATERIALS AND METHODS

During the years 1997-2001, a total of 608 mastitic milk samples of 580 dairy farm cows, from Northern Greece, were cultured. Antibacterial treatment was administered to 50% of the sampled animals. The first streams of milk were

μαστίτιδας είναι εφικτή με τη λήψη δείγματος γάλακτος και τη χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων.

Σκοπός της έρευνας ήταν η διερεύνηση της μυκητιακής μαστίτιδας των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων με απομόνωση και ταυτοποίηση των υπεύθυνων μυκήτων, καθώς δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για τις μαστίτιδες αυτές στην Ελλάδα.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εξετάστηκαν 608 δείγματα γάλακτος προερχόμενα από ισάριθμα τεταρτημόρια 580 αγελάδων με συμπτώματα κλινικής μαστίτιδας από τη Βόρειο Ελλάδα κατά τη διάρκεια των ετών 1997-2001. Στο 50% των ζώων είχε δοθεί αντιβακτηριακή αγωγή χωρίς να προηγηθεί απομόνωση ή/και δοκιμή ευαισθησίας του αιτιολογικού παράγοντα. Οι πρώτες ακτίνες γάλακτος απορρίπτονταν, ενώ στη συνέχεια συλλεγόταν άσπρη το δείγμα το οποίο αποθηκευόταν στους 4 °C. Η σπορά γινόταν εντός 24 ωρών σε Brain Heart Infusion άγαρ, Chapman άγαρ, MacConkey άγαρ για απομόνωση βακτηρίων και Sabouraud dextrose άγαρ με χλωραμφενικόλη 0,2% για απομόνωση μυκήτων.

Τα τρυβλία πετρί για την απομόνωση των βακτηρίων επωάζονταν για 48 ώρες στους 37 °C, ενώ για την απομόνωση των μυκήτων από τα δύο πετρί με Sabouraud άγαρ το ένα επωάζονταν στους 37 °C για μία εβδομάδα και το άλλο στους 26 °C για δύο εβδομάδες.

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν με βάση τα καλλιεργητικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους σύμφωνα με τους Quinn και συν. (1999).

Οι μυκητυλλιακοί μύκητες που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους (Barnett και συν. 1990). Για την ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων χρησιμοποιήθηκε το API 20C AUX (Biomerieux).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από το σύνολο των 608 δειγμάτων γάλακτος που εξετάστηκαν, απομονώθηκαν μύκητες σε 42 (6,9%). Από αυτούς οι 38 (90,4%) ήταν ζυμομύκητες και οι 4 (9,6%) ήταν μυκητυλλιακοί μύκητες. Οι ζυμομύκητες που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν στα γένη *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*. Από τα 34 στελέχη του γένους *Candida* βρέθηκε ότι 14 ήταν *C. tropicalis*, και 6 *C. krusei*. Επίσης, 4 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*), 4 ως *C. albicans*, 3 ως *C. parapsilosis* και 3 ως *C. rugosa*, ενώ 2 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Geotrichum candidum* και 2 ως *Rhodotorula* spp. (Πιν.1) Οι 4 μυκητυλλιακοί μύκητες που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως *Aspergillus* spp.

Καθαρές καλλιέργειες ζυμομυκήτων αναπτύχθηκαν σε 38 από τα 608 δείγματα γάλακτος. Σε 4 περιπτώσεις ζυμομύκητες αναπτύχθηκαν μαζί με βακτήρια, ενώ σε 510 περιπτώσεις αναπτύχθηκαν μόνον βακτήρια. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ήταν *Staphylococcus* spp. 62,3%, *Streptococcus* spp. 19,7% και σε μικρότερο ποσοστό *E.*

**Πίνακας 1.** Ζυμομύκητες που απομονώθηκαν από μολυσμένους μαστικούς αδένες αγελάδων

**Table 1.** Yeasts isolated from infected cows' mammary glands

Είδη που απομονώθηκαν/ Isolated species	No	%
<i>C. tropicalis</i>	14	36,8
<i>C. krusei</i>	6	15,7
<i>C. albicans</i>	4	10,5
<i>C. Kefyr</i> ( <i>C. pseudotropicalis</i> )	4	10,5
<i>C. parapsilosis</i>	3	7,9
<i>C. rugosa</i>	3	7,9
<i>G. candidum</i>	2	5,26
<i>Rhodotorula</i> spp.	2	5,26
<b>Σύνολο / Total</b>	<b>38</b>	

discarded and the aseptically collected samples kept at a temperature of 4 °C and plated at the latest 24 hours, after sampling on Brain-heart infusion agar, Chapman agar, Mac Conkey agar for bacterial isolation and Sabouraud dextrose agar, complemented with 0.2% of chloramphenicol for fungal isolation.

The plates for the bacterial isolation were incubated for 48h at 37 °C and two Sabouraud plates were kept, one at 37 °C for one week and the other one at 26 °C for 2 weeks before discarded.

The isolated bacteria were identified according to Quinn et al. (1999), using cultural and biochemical characteristics.

Moulds identification was performed on the base of morphological and physiological characteristics of the isolates (Barnett et al. 1990). The yeasts identification was performed using the api 20C AUX yeasts identification system (Biomerieux).

## RESULTS

From the 608 milk samples examined, 42 (6.9 %) fungi were isolated. Among these, 38 (90.4%) were yeasts and 4(9.6%) moulds. The yeasts isolates were classified into the genera of *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*. From the 34 *Candida* species, 14 were identified as *C. tropicalis* and 6 as *C. krusei*. Furthermore, 4 isolates were identified as *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*) and 4 as *C. albicans*, 3 as *C. parapsilosis* and 3 as *C. rugosa*. *Geotrichum candidum* and *Rhodotorula* spp were represented with 2 isolates (Tab.1). The 4 moulds isolates were classified into the genus *Aspergillus*.

Pure fungal isolates were obtained in 38 milk samples. In 4 samples fungi were mixed with bacteria. In 510 milk samples only bacteria were cultured. The bacteria were primary *Staphylococcus* spp. 62.3%, *Streptococcus* spp. 19.7% and in lower percentage *E. coli*, *Corynebacterium* spp. and *Pasteurella* spp.

In the remaining 56 mastitic milk samples, there was no microorganism isolated.

*coli*, *Corynebacterium* spp. και *Pasteurella* spp.

Από 56 δείγματα γάλακτος δεν απομονώθηκε κανένας μικροοργανισμός.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ποσοστά απομόνωσης ζυμομυκήτων και μυκητυλειακών μυκήτων από γάλα αγελάδων με μαστίτιδα ποικίλουν σημαντικά στις διάφορες χώρες. Στην Ευρώπη το ποσοστό αυτό κυμαίνεται από 4,4 έως 6% (Hofmann και συν. 1965, Chermette και Bussieras 1993, Lagneau και συν. 1996, Moretti και συν. 1998) στις ΗΠΑ μέχρι και 7% (Richard και συν. 1980, Kirk και Bartlett 1986) ενώ σε τρίτες χώρες είναι μεγαλύτερο του 12% (Awad και συν. 1980, Kitamura και συν. 1990, Singh και συν. 1992, Costa και συν. 1993).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας, οι μαστίτιδες των αγελάδων που οφείλονται σε μύκητες ανέρχονται σε 6,9%. Το 6,25% από αυτές οφείλεται σε ζυμομυκήτες και μόνο το 0,65% σε μυκητυλειακούς. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών που αφορούσαν ευρωπαϊκές χώρες (Chermette και Bussieras 1993). Η συχνότερη παρουσία των ζυμομυκήτων σε σχέση με τους μυκητυλειακούς, πιθανό να οφείλεται στην καλύτερη δυνατότητα των πρώτων να επιβιώνουν στο μαστικό αδένια καθώς και στο γεγονός ότι ορισμένοι ζυμομυκήτες χρησιμοποιούν αντιβακτηριακά, όπως πενικιλίνες ή/και τετρακυκλίνες ως πηγές αζώτου (Menhert και συν. 1964, Farnsworth και Sorensen 1972, Fransworth 1977).

Οι ζυμομυκήτες του γένους *Candida* έχουν ήδη χαρακτηριστεί ως παθογόνοι για το μαστικό αδένια των αγελάδων (Loftsgard και Lindquist 1960, Farnsworth και Sorensen 1972, Fransworth και Sorensen 1975, Spika και Petrovic 1975). Κατά τη δική μας έρευνα 34 από τους 38 ζυμομυκήτες που απομονώθηκαν ανήκαν σε είδη του γένους *Candida* (πιν.1). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους Farnsworth και Sorensen (1972), Richard και συν. (1980) και Keller και συν. (2000). Από το σύνολο των 34 ζυμομυκήτων του γένους *Candida* που απομονώθηκαν, η πλειονότητα ανήκε στο είδος *C. tropicalis* 14 στελέχη (ποσοστό 36,8%), γεγονός που συμφωνεί με τα ευρήματα των Spika και συν. (1957), Richard και συν. (1980) και Moretti και συν. (1998). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με τα ευρήματα των Farnsworth και Sorensen (1972) και Elad και συν. (1995), οι οποίοι αναφέρουν ότι η *C. krusei* απομονώνεται με μεγαλύτερη συχνότητα, ενώ η *C. tropicalis* κατέχει την τέταρτη ή πέμπτη θέση στη σειρά συχνότητας απομόνωσης.

Σε ό,τι αφορά την *C. albicans* κατά τη διάρκεια της δικής μας έρευνας, ο μικροοργανισμός απομονώθηκε μόνο 4 φορές, ποσοστό 10,5%, γεγονός που συμφωνεί με αντίστοιχες έρευνες στην Ιταλία (Bellani και συν. 1973, Moretti και συν. 1998), σε αντίθεση με ορισμένους άλλους ερευνητές που την απομόνωσαν σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά 1,5-4% (Spika 1957, Farnsworth και Sorensen 1972, Richard και συν. 1980). Όπως φαίνεται από τη βιβλιο-

## DISCUSSION

The percentage of the yeasts and moulds, isolation from mastitic milk varies considerably in many countries. In European countries this percentage varies from 4.4% up to 6% (Hofmann et al. 1965, Chermette and Bussieras 1993, Lagneau et al. 1996, Moretti et al. 1998), in the USA up to 7% (Richard et al. 1980, Kirk and Bartlett 1986), while in other countries it is higher than 12% (Awad et al. 1980, Kitamura et al. 1990, Singh et al. 1992, Costa, et al. 1993).

The present study revealed that a percentage of 6.9% of cow mastitis was due to fungi, especially 6.25% to yeasts and only 0.65% to moulds. Our findings are similar to those reported in other European countries (Chermette and Bussieras 1993). The common occurrence of yeasts, when compared with moulds, may be due to their better survival and growth in the mammary gland and also to the fact that some yeasts species can utilize antibiotics, like penicillin and/ or tetracycline, as a nitrogen source for growth (Menhert et al. 1964, Farnsworth and Sorensen 1972, Fransworth 1977).

The yeasts of the genus *Candida* have previously been described as being pathogenic for the bovine mammary gland (Loftsgard and Lindquist 1960, Farnsworth and Sorensen 1972, Fransworth and Sorensen 1975, Spika and Petrovic 1975). In this study, *Candida* species were most frequently encountered and made 34 of the 38 isolates (tabl. 1). Farnsworth and Sorensen (1972), Richard et al. (1980) and Keller et al. (2000) reported similar findings. Among the *Candida* species, the most frequent isolate was *C. tropicalis* (14/34, 36.8%), which agrees with the findings of Spika et al. (1957), Richard et al. (1980) and Moretti et al. (1998). This is not in agreement with Farnsworth and Sorensen (1972) and Elad et al. (1995), who reported *C. krusei* as the most commonly isolated yeast and *C. tropicalis* as the fourth or the fifth isolate.

During the present study, *C. albicans* isolated 4 times or 10.5%, which is in agreement with the findings in Italy (Bellani et al. 1973, Moretti et al. 1998), but some other authors (Spika 1957, Farnsworth and Sorensen 1972, Richard et al. 1980) isolated *C. albicans* at a lower percentage (1.5-4%). Nevertheless, according to the literature and to our findings (table 1), *C. albicans*, the most widely and known of the genus *Candida*, does not appear to be the major causative agent for yeast mammary gland infection.

Yeasts were isolated in pure culture, in 38 cases, from clinical mastitis quarter, showing their pathogenicity to the mammary gland being either primary or secondary disease agents. Even when associated with bacteria, in 4 cases, they constitute a real problem once the therapy against bacterial mastitis is unsuccessful in eliminating the fungi presence in the quarter. This finding is in agreement with other researchers (Prasad and Prasad 1966, Fransworth 1977, Richard et al. 1980).

The isolation of fungi, post-antibiotic treatments,

γραφία, αλλά και τα δικά μας ευρήματα, η *C. albicans*, το γνωστότερο και πιο διαδεδομένο είδος του γένους, δεν αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα της μυκητιακής αιτιολογίας μαστίτιδας των αγελάδων.

Σε 38 περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας από ισάριθμα τεταρτημόρια απομονώθηκαν ζυμομύκητες σε καθαρή καλλιέργεια και πιστεύεται ότι στις περιπτώσεις αυτές αποτελούσαν πρωτογενή ή δευτερογενή αιτιολογικό παράγοντα. Στις 4 περιπτώσεις που απομονώθηκαν μαζί με βακτήρια φαίνεται ότι έπαιζαν καθοριστικό ρόλο οι ζυμομύκητες στην εκδήλωση της κλινικής μαστίτιδας, αφού η αντιβακτηριακή θεραπευτική αγωγή που ακολουθήθηκε επιδείνωσε το πρόβλημα στο μαστικό αδέν, όπως αναφέρουν και άλλοι ερευνητές (Prasad και Prasad 1966, Fransworth 1977, Richard και συν. 1980).

Κατά τη δική μας έρευνα, η απομόνωση των μυκήτων από προσβεβλημένα τεταρτημόρια μετά από θεραπεία με αντιβακτηριακά επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η εγκατάστασή τους διευκολύνεται εξαιτίας της απουσίας των βακτηρίων που συνιστούν τη φυσιολογική χλωρίδα του μαστού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πολλά περιστατικά μυκητιακής αιτιολογίας μαστίτιδας έχουν εκδηλωθεί έπειτα από ενδομαστική θεραπεία με αντιβακτηριακά (Prasad και Prasad, 1966, Topolka 1968, Fransworth 1977, Chengappa και συν. 1984). Πιστεύεται, ότι η πλειονότητα των περιστατικών αυτών είναι αποτέλεσμα παρατεταμένης και τυφλής θεραπευτικής αγωγής με αντιβακτηριακές ουσίες.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας προκύπτει ότι οι μυκητιακής αιτιολογίας μαστίτιδες κατέχουν ένα ποσοστό 6,9% το οποίο θεωρείται σημαντικό. Είναι προφανές ότι οι ζυμομύκητες εμπλέκονται στην παθογένεια της μαστίτιδας και προκαλούν οικονομικές απώλειες οι οποίες αφορούν στη μείωση της γαλακτοπαραγωγής, στο κόστος της θεραπευτικής αγωγής και πολλές φορές και στην απώλεια του μαστικού αδέν.

Συμπεραίνεται ότι θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στα αυξημένα ποσοστά μυκητιακής αιτιολογίας μαστίτιδας αγελάδων. Προτείνεται το πρόβλημα αυτό να διερευνηθεί σε βάθος σε χώρες -όπως η Ελλάδα- όπου γίνεται κατάχρηση αντιβακτηριακών ουσιών που χορηγούνται ενδομαστικά, δεδομένου ότι σε πολλές περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας οι αγωγές γίνονται τυφλά, χωρίς να έχει προηγηθεί απομόνωση ή/και δοκιμή ευαισθησίας του αιτιολογικού παράγοντα στις χορηγούμενες αντιβακτηριακές ουσίες. □

suggests that they are not only resistant to them, but can more readily produce disease in absence of the commensal bacterial microflora in the udder. According to the bibliography, many outbreaks of mycotic mastitis have occurred, following intramammary antibiotic therapy (Prasad and Prasad 1966, Topolka 1968, Fransworth 1977, Chengappa et al. 1984). It is believed that, in most of our cases, mycotic mastitis could be the result of a serial treatment with antibacterial antibiotics given blindly to the animals.

The results of the present study indicate that a level of 6.9% of mycotic mastitis is significant and yeasts are apparently implicated in mammary gland pathology causing economic loss due to the reduced milk production, loss of use of the affected quarters and due to therapy costs.

It can be concluded that attention must be paid to the increasing population of fungi in the etiology of bovine mastitis, especially where large doses of antibacterial antibiotics are given blindly for intramammary therapy, without prior isolation and/or sensitivity test of the aetiological agent. □

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Awad, F., Mola, A., Fayed, A., Abd, el-Halim., Refai, M., (1980). Studies of mycotic mastitis in Egypt. *J Egyptian Vet Med Ass*: 40(3) : 35-41
- Barnett, J.A., Pague, R.W., Yarrow, D., (1990). *Yeasts characteristics and identification*. Cambridge University Press, Second ed
- Bellani, L., Nardelli, L., Boni, P., 1973. La mammitte bovine en Italie du Nord. *Bull Off Int Epizootes* 79:1109-17
- Costa, E.O., Gandra, C.R., Pires, M.F., Coutinho, S.D., Castilho, W., Teixeira, C.M., (1993). Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brasil *Mycopathologia*. 124:13-17
- Chengappa, M.M., Maddux, R.L., Greer, S.C., Pincus, I.H., Geist, L.L., (1984). Isolation and identification of yeasts and yeast-like organisms from clinical veterinary sources. *J Clin Microbiol* 19: 427-28
- Chermette, R., Bussieras, J., (1993). *Parasitologie Veterinaire Fasc. V: Mycologie*. Ec Nat Vet d' Alfort
- 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. *J Am Vet Med Assoc* Sep 1 207(5):620-2
- Farnsworth, R.J., Sorensen, D.K., (1972). Prevalence and species distribution of yeast in mammary glands of dairy cows in Minnesota. *Can J Comp Med* 36: 329-332
- Fransworth, R., Sorensen, D.K., (1975). The effect of penicillin, dihydrostreptomycin and Prednisolone Treatment of Experimental *Candida krusei*. *Can J Comp Med*, 39 : 340-348
- Fransworth, R.J., (1977). Significance of fungal mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 170: 1173-1174
- Hofmann, W., Immer, J., Lanz., E., (1965). Mycotic mastitis in cattle. *Wien Tierarztl Mschr*: 52:385-91
- Keller, B., Scheibl, P., Bleckmann, E., Hoedemaker, M., (2000). Differentiation of yeasts in mastitis milk *Mycoses* 43 Suppl 1:17-9
- Kirk, J.H., Bartlett, P.C., (1986). Bovine mycotic mastitis. *Compendium Food Animal* 8:106-110
- Kitamura, H., Anri, A., Fuse, K., Seo, M., Itakura, C., (1990). Chronic mastitis caused by *Candida maltosa* in a cow. *Vet Pathol* 27:465-66
- Lagneau, P.E., Labtahi, K., Swinne, D., (1996). Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia*. 135 (2): 99-102
- Loftsgard, G., Lindquist, K., (1960). Bovine mycotic mastitis. *Acta Vet Scan* 1:201-220
- Menhert, B., Ernst, K., Gedek, W., (1964). Hefen als Mastitiserrger bei Rind. *Zentralblatt Veterinarmed* 11a:97-121
- 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). *Zentralbl Veterinarmed (B) Apr*; 45(3):129-32
- Prasad, L., Prasad, S., (1966). Bovine mastitis caused by a Yeast in India *Vet Rec* 79 (25) 809-810
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R., (1994). In : *Clinical Veterinary Microbiology* p:327
- Richard, J.L., McDonald, J.S., Fichtner, R.E., Andersen, A.J., (1980). Identification of yeast from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. *Am J Vet Res* 41:1991-94
- Singh, S.D., Thakur, D.K., Sudhan, N.A., Verna, B.B., (1992). Incidence of mycotic mastitis in cows and buffaloes. *Indian Vet J* 69:86-87
- Sipka, M., Petrovic, D., (1975). High incidence of mycotic mastitis in cattle. *Zentralbl Veterinarmed (B)* 22:353-361
- Spika, M., (1957). *Candida tropicalis* as the cause of bovine mastitis *Vet.Glasn.* 11:747-51
- Topolka, S., (1968). Mycotic mastitis. *Vet Arh* 38:242-246
- Weigt U., (1970). Yeast-contaminated antibiotics as a cause of yeast mastitis. *DWT* 77:538-541