

# Izolarea algelor din genul *Prototheca* din lapte și importanța acestora în patologia mamară la bovine

OGNEAN L.

Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca

## INTRODUCERE

Frecvența crescută a infecțiilor mamare bacteriene, produse de agenți patogeni majori (stafilococi, streptococi, colibacili etc.), alături de dificultatea elucidării diagnosticului etiologic, generează în mod nejustificat tendința de a minimaliza importanța unor microorganisme rar întâlnite pentru patogenia mamitelor bovine. În această grupă sunt incluse și alghele fără clorofilă din genul *Prototheca*, alături de fungi, micoplasme, leptospire, micobacterii (5,6,8).

## MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru determinarea structurii microflorei microbiene a secreției lactate normale și patologice au fost efectuate investigații microbiologice complexe, pe 894 probe de lapte recoltate din 8 ferme de vaci situate în zona centrală a Transilvaniei.

Prin anchetele periodice efectuate în cele 5 ferme și 3 microferme au fost controlate 1415 vaci în lactație, de la care au fost prelevate 412 probe de lapte normal și 482 probe de lapte patologic.

Probele recoltate au fost încadrate în două categorii: lapte normal și mastitic, pe baza rezultatelor obținute la examenul fiecărui sfert mamar înainte de prelevare, utilizând testul Californian pentru depistarea mamitelor (CMT).

Pentru izolarea și identificarea principalilor taxoni componenți ai microflorei din lapte s-au efectuat investigații microbiologice complexe bacteriologice și micologice.

Examenul bacteriologic a inclus efectuarea de însămânțări pe bulion și agar simplu, cu

determinarea principalelor caractere morfologice la culturile obținute, respectiv încadrarea acestora pe tipuri de colonii. Identificarea genurilor și speciilor bacteriene a necesitat utilizarea de medii selective și investigații biochimice specifice (6,8).

Examenul micologic a necesitat o succesiune de investigații specifice, recurgând la unele teste comparative de tipizare fungică, incluse într-un protocol experimental pentru izolarea și identificarea fungilor (6,7).

Probele de lapte rămase după însămânțare, s-au omogenizat și centrifugat la 3000 rot./min, timp de 30 de minute, iar din sedimentul obținut s-au efectuat preparate native și frotiuri. Acestea au fost colorate prin metodele Newman (cu albastru de metilen), Gram, May Grunwald Giemsa (MGG) și Ihone (cu fuxină fenicată) și apoi examinate microscopic.

Izolarea și identificarea algelor din genul *Prototheca* a fost facilitată de dezvoltarea abundentă a culturilor pe mediile microbiologice uzuale, în special pe cele agarizate. Pentru diferențierea elementelor morfologice și evidențierea celor tipice genului *Prototheca*, au fost examinate comparativ preparatele native și frotiurile colorate prin metodele menționate, efectuate din sedimentul de lapte și/sau culturile obținute.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma investigațiilor microbiologice efectuate, am relevat aspecte diverse privind structura microflorei izolate din laptele normal și patologic (6,7). Prin datele prezentate în această lucrare dorim să semnalăm o diversificare a

microflorei din lapte prin prezența algelor alături de bacterii și fungi.

Componentele bacteriană și fungică a microflorei din laptele normal și mastitic, au fost prezentate și analizate în detaliu (5,6,7), fără referiri temeinice la cea de a 3-a componentă, mai puțin cunoscută, reprezentată prin algele fără clorofilă din genul *Prototheca*.

Prelucrarea datelor rezultate din cercetările efectuate pe 412 probe de lapte normal și 482 probe de lapte mastitic recoltate din cele 8 ferme, au stabilit portajul cu alge al secreției lactate normale la 0,72%, iar a celei patologice la 3,31% (Tabel 1).

**Tabel 1**  
Frecvența identificării algelor din genul *Prototheca* în laptele normal și mastitic, provenit din 8 ferme de vaci din Transilvania

Nr.	Gruparea fermelor după numărul de probe investigate	Lapte normal			Lapte mastitic		
		Probe			Probe		
		investigate	pozitive		investigate	Pozitive	
		nr.	nr.	%	nr.	nr.	%
1	Ferma de Cercetare SCPCB Tg.Mureș	88	2	2,27	145	14	9,65
2	Ferma de Producție SCPCB Tg.Mureș	74	-	-	112	1	0,89
3	Ferma Chintău - IAS Cluj	68	-	-	73	-	-
4	Ferma SDE Cluj	82	1	1,21	52	1	1,92
5	Ferma Duvana - SCPCP Cluj	47	-	-	45	-	-
6	Microferma Remetea Mureș	22	-	-	24	-	-
7	Microferma Sîncrai Mureș	16	-	-	16	-	-
8	Microferma Sînpaul Mureș	15	-	-	15	-	-
Media		412	3	0,72	482	16	3,31

În cazul laptelui mastitic, majoritatea probelor pozitive (9,65%) au provenit din Ferma de Cercetare SCPCB Tg.Mureș, în care au evoluat frecvent episoade de mamite clinice sau cronice rebele la terapia cu antibiotice. În alte două ferme a mai fost semnalată câte o probă de lapte mastitic conținând alge (0,89%, respectiv 1,92%), frecvența de izolare fiind scăzută, în timp ce în celelalte 5 ferme nu a fost înregistrată prezența acestor microorganisme.

Portajul laptelui normal pentru *Prototheca*, stabilit prin investigațiile efectuate are doar valoare de semnalare, fiind întâlnit numai în două ferme (2,27%, respectiv 1,21%) din cele 8 anchetate.

Conform opiniilor actuale unanim exprimate de cercetătorii în domeniu (1,4,7,8), microflora secreției mamare este extrem de diversă, fiind constituită în principal din asociații polimicrobiene. În acest context pot fi încadrate și datele obținute de noi, care au relevat asocierea frecventă între bacterii și fungi, uneori alăturându-se și algele. Componenta bacteriană a

microflorei semnalate a inclus: stafilococi (27,1%), streptococi (16,3%), micrococi (13,0%), diplococi (14,1%), bacili Gram pozitivi (5,4%), bacterii Gram negative (3,2%), antracoizi (4,3%), floră mixtă (11,9%) și floră nespecifică (4,3%), iar componenta micotică a fost dominată de unele specii de *Candida*: *C.tropicalis* (20,8%), *C.rugosa* (8,5%), *C.albicans* (8,0%) și *C.krusei* (6,9%).

La examenul microscopic al frotiurilor colorate, efectuate din laptele sedimentat, s-au evidențiat în cazul a 3 probe, elemente morfologice tipice pentru identificarea algelor din genul *Prototheca*. Acestea au fost bine relevate prin colorația MGG, reprezentând structuri celulare de formă rotundă sau ovală, care includ mai multe formațiuni sferice cu aspect de endospori sau celule fiice.

Sub aspect cultural, am remarcat o dezvoltare abundentă a culturilor de alge pe mediile microbiologice uzuale, preferând geloza și agarul Sabouraud. Coloniile asemănătoare cu cele levurice, având dimensiuni variabile și

culoare gri-albicioasă, s-au dezvoltat bine pe agar la 20-37°C, după 24-48 de ore de la însămânțare (Figura 1).

Examenul microscopic al preparatelor native și frotiurilor efectuate din masa culturală, a relevat prezența unor formațiuni asemănătoare cu

sporangele, având dimensiuni mari (10-30 μm) și conținând 4-8 celule fiice. Aceste structuri au fost ușor evidențiate atât în preparatele native, cât și în cele colorate; în cercetările efectuate am obținut detalii morfologice clare prin utilizarea colorației MGG.



**Figura 1**

Aspectul morfologic al coloniilor de *Prototheca spp.*, abundant dezvoltate pe agar Sabouraud la 5 zile după însămânțare

Genul *Prototheca* include mai multe specii de alge fără clorofilă, cu răspândire ubicvitară: sol, apă, nămol, fecale de bovine etc. Prezența acestora în lapte poate avea și origine endogenă, ca rezultat al multiplicării în structurile mamare (1,2,4,8,9).

Prima semnalare privind patogenitatea algelor din genul *Prototheca* aparține lui *Lerche*, care în 1952 descrie în Germania un caz de mamită bovină produsă de *P.zopfii*. Aceasta a reprezentat de fapt și prima informație referitoare la producerea unor infecții cu alge la mamifere (2). Pornind de la rezultatele obținute de *Lerche*, *Schiefer* și *Gedek* (1968), reproduc infecția mamară experimentală la vacă cu *P.moriformis*; simptomele de mamită s-au declanșat la două zile postinfectant și aceasta a avut caracter purulent.

Informații mai consecvente privind importanța etiopatogenetică a algelor în patologia mamară la

bovine, apar de abia după 25 de ani de la prima semnalare. Astfel, *Schönborn* și *Seffner* (1977) fac investigații ample în mamita bovină produsă de *P.trispora*, iar în 1978 *Gedek* și *Weber* descriu un episod enzootic de mamite cu *Prototheca* la vaci în lactație. Autorii relevă transmiterea infecției în focar și rezistența agentului etiologic la terapiile uzuale, în special la antibiotice, aducând drept argumente finalizarea episodului amintit, cu sacrificarea a 22 de vaci din cele 88 infectate.

În ultimele două decenii se remarcă o extindere a cercetărilor privind acțiunea patogenă a speciilor de *Prototheca* asupra glandei mamare, fiind semnalate infecții mamare în diverse zone: USA, Australia, Danemarca, Israel, Canada (1,3,8,9). Rezultatele unor cercetări subliniază caracterul invaziv al infecției, în care formele vegetative de *Prototheca* pătrund în alveole, endoteliu și interstițiu, producând distrugerii importante și

inflamații piogranulomatoase, însoțite de hiposau chiar agalaxie (1,2,5,9).

De asemenea, se impune relevarea diversificării acțiunii patogene atribuite genului *Prototheca* și pentru alte specii de animale, algele fiind izolate de regulă din fecale, cum este cazul ovinelor și cabalinelor sau din urina unor câini cu nefrită cronică (2). Actualmente, se atribuie patogenitate următoarelor specii de *Prototheca*: *P.zopfii*, *P.wicherhami*, *P.moriformis* și *P.trispora*, care sunt implicate în exclusivitate în producerea mamitelor la vaci (6,7).

## CONCLUZII

1. Prin investigațiile microbiologice efectuate pe probe de lapte normal (n=412) și mastitic (n=482), provenite din 8 ferme de vaci, situate în zona centrală a Transilvaniei a fost izolată o microfloră complexă conținând alge, fără clorofilă din genul *Prototheca*, alături de bacterii și fungi.

2. Portajul laptelui normal pentru *Prototheca*, a avut doar valoare de semnalare, fiind stabilit la 0,72% și întâlnit numai în două ferme (2,27%, respectiv 1.21%) din cele 8 anchetate.

3. În cazul laptelui mastitic, în 3,3% din probe s-au identificat și alge, majoritatea (9,65%) provenind din ferma de cercetare SCPCB Tg.Mureș, în care au fost semnalate mamite clinice și cronice antibioticorezistente.

4. Cultural, algele s-au dezvoltat bine pe geloză și agar Sabouraud, la 20-37°C, după 24-48 de ore de la însămânțare, formând colonii atipice de culoare gri-albicioasă și dimensiuni variabile.

5. Identificarea algelor și încadrarea în genul *Prototheca*, s-a bazat pe elemente morfologice de certă valoare taxonomică; sporange de dimensiuni mari (10-30 μm), conținând 4-8 celule fiice, structuri bine evidențiate în preparatele microscopice colorate MGG.

## SUMMARY

### Isolation of genus *Prototheca* from milk and its importance in bovine mammary pathology

In the biological investigation, made on samples of normal (n=412) and mastitis (n=482) milk, proceeded from eight dairy cows farm, by Transilvania, it was signal the presence of the algas without chlorophyll belonging to *Prototheca* forming together with bacteria and fungi the micro flora of the mammary gland.

The alga content of normal milk was signalled only in 2 farms (2.27%, respectively 1.21%), being established to 0.72%. In the case of mastitis milk the percentage of positive samples raised up to 3.3%, the isolating frequency being important only in one farm (9.6%), where were episodes of antibiotic resistant mastitis.

The algas were well develop on gelose and Sabouraud agar, at 20-37°C, and their identification as *Prototheca*, was based on making evident the typical morphological elements, big sporangium (10-30 μm) containing 4-8 daughter cells, easy differentiation structures in native preparations and MGG stained smears.

## BIBLIOGRAFIE

1. Aalbek,B., Stenderup,J., Jensen,E.H., Valbak,J., Nylin,B., Huda,A., (1994) - Mycotic and Algal Bovine Mastitis in Denmark, *Acta Path.Microbiologica Immunologica Scandinavica*, 102(6), 451-456.
2. Bergann,A., (1993) - Experimental Prototheca Mastitis in the Cow and its Treatment with Teramisol Hydrochloride. *Berliner und Munchener Tierarztlitche Wochenschrift*, 106, 257-260.
3. Enders,F., Weber,A., (1992) - Vorkommen und bedeutung von algen der gattung Prototheca bei tieren, *VET*, 2, 16-21.
4. Jensen,H.E., Aalbek,B., (1994) - Pathogenity of Yeasts and Algae Isolated from Bovine Mastitis Secretions in a Murine Model. *Mycoses*, 37(3-4), 101-107.
5. Ognean,L., Statov,C., Merlescu.L., Oană,L., (1993) - Particularități ale diagnosticului micologic în mastite la vaci. *Bul.USACN-ZMV*, 47,165-173.
6. Ognean,L., (1997) - Mamitele micotice la bovine în Transilvania: cercetări etiopatogenetice, diagnostice și terapeutice. Teză pentru obținerea titlului științific de “Doctor în Medicină Veterinară”. *Fac. de Medicină Veterinară, Cluj-Napoca*.
7. Ognean,L., (1997) - Mamitele micotice la bovine. Edit. Casa Cărții de tiință, Cluj-Napoca.
8. Quinn,P.J., Carter,M.E., Markey,B., Carter,G.R., (1994) - *Clinical Veterinary Microbiology* M.Wolfe.
9. Tarte,K., Becera,T., Alvarez,O.S., Villareal,A., (1992) - Mastitis Bovine Clinica causada por algas del genero Prototheca. *VEt.Bull.*, 62(4),326.