



MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.,
veterinární lékař
SVÚ Olomouc

Řasy z rodu *Prototheca* jako původci mastitid skotu

J. BZDIL

Státní veterinární ústav Olomouc

SOUHRN

Bzdil J. **Řasy z rodu *Prototheca* jako původci mastitid skotu.** Veterinářství 2013;63:

Cílem této práce bylo seznámit odbornou veřejnost s environmentálními původci mastitid skotu z rodu *Prototheca* (zelené achlorofilní řasy), metodami jejich diagnostiky, jejich prevalencí a citlivostí vůči antimikrobiálním látkám. V letech 2008 – 2012 bylo na SVÚ Olomouc vyšetřeno celkem 22688 čtvrtových vzorků kravského mléka. Jejich kultivace byla provedena na masopectonový krevní agar (MPKA) a Sabouraud Glucose Agar (SGA) (Trios s.r.o., Praha, ČR). Inkubace byla provedena při teplotě $30\pm 1^\circ\text{C}$ a paralelně při $37\pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 48 – 72 hodin. Izolované kmeny byly potvrzeny za stejných podmínek biochemickými testy Nefermtest 24 (Erba – Lachema, Brno, ČR). Ve sledovaném období bylo detekováno 109 kmenů tří druhů rodu *Prototheca* (prevalence 0,48 %). Jednalo se o *Prototheca zopfii* gen. 1 a 2, *Prototheca stagnora* a *Prototheca wickerhamii*. Testace citlivosti byla provedena diskovou difúzní metodou s použitím disků ((Ittest PLUS s.r.o., Hradec Králové, ČR; OXOID a.s., Brno, ČR) a SGA (Trios s.r.o., Praha, ČR). Inkubace proběhla opět při $30\pm 1^\circ\text{C}$ respektive $37\pm 1^\circ\text{C}$ (dle druhu původce) po dobu 48 hodin. Nejvyšší citlivost byla zjištěna in vitro u nystatinu (100 %).

SUMMARY

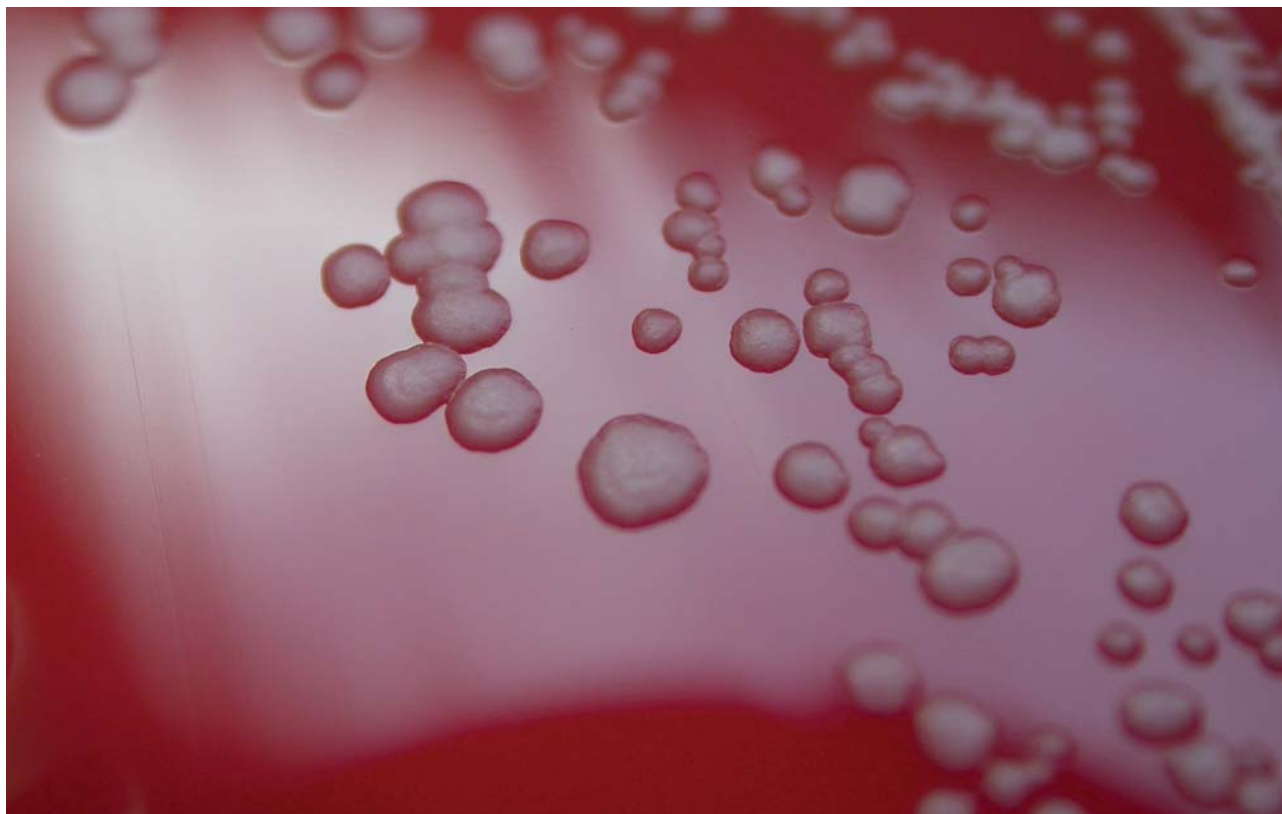
Bzdil J. **Algae from the species *Prototheca* as a causal agents of bovine mastitis.** Veterinářství 2013;63:

The aim of presented work was to acquaint professional public with environmental causal agents of bovine mastitis from the species *Prototheca* (achlorophil green algae), methods of their diagnostics, their prevalence, and susceptibility to antimicrobial substances. A total of 22688 quarter samples of bovine milk were examined at SVÚ Olomouc during the years 2008 to 2012. Their cultivation was performed on agar meat infusion (MPKA) and Sabouraud Glucose Agar (SGA) (Trios s.r.o., Prague, CZ). Incubation was performed at $30\pm 1^\circ\text{C}$ and simultaneously at $37\pm 1^\circ\text{C}$ for 48 – 72 hours. Isolated strains were confirmed under the same conditions using biochemical tests Nefermtest 24 (Erba – Lachema, Brno, CZ). During monitored period were detected 109 strains of three species *Prototheca* (prevalence 0.48%). It was a *Prototheca zopfii* gene. 1 and 2, *Prototheca stagnora*, and *Prototheca wickerhamii*. Sensitivity testing was performed by means of disc diffusion method using discs ((Ittest PLUS Ltd., Hradec Kralové, CZ; Oxoid Ltd., Brno, CZ), and SGA (Trios Ltd., Prague, Czech Republic). Incubation went through again at $30\pm 1^\circ\text{C}$ respectively $37\pm 1^\circ\text{C}$ (depending on type of agent) for 48 hours. Highest sensitivity was observed in vitro in nystatin (100%).

Úvod

Také rostlinná říše (*Plantae*) zahrnuje medicínsky významné organismy, které mohou kolonizovat makroorganismus zvířat a lidí, případně ho poškodovat tvorbou nejrůznějších toxických metabolitů a v ojedinělých případech u nich způsobovat i orgánová nebo dokonce systémová onemocnění. V povědomí laické i odborné veřejnosti jsou asi nejlépe zafixovány modré řasy (Oddíl: *Cyanophyta*,

Cyanobacteria) vyskytující se zcela běžně v přírodě, především v povrchových a odpadních vodách. Tyto organismy jsou známé svou produkcí široké škály metabolitů, jež se ve vztahu k makroorganismu vyšších živočichů mohou prezentovat zejména jako hepatotoxiny, neurotoxiny a dermatotoxiny. Z nejvýznamnějších taxonů produkujících tyto látky lze jmenovat například druhy *Anabaena*,



Obr. 1 – Porost *P. zopfii* na MPKA (foto: autor)

Microcystis, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis* a *Aphanizomenon*.¹ Také mezi zelenými řasami (Oddíl: *Chlorophyta*) lze najít patogenní organismy. Zejména rod *Prototheca* (Čeleď: *Chlorellaceae*, Řád: *Chlorellales*, Třída: *Trebouxiophyceae*) je známý svou schopností kolonizovat organismus vyšších živočichů a uplatňovat se jako původce onemocnění. Jeho výskyt je celosvětový. *Prototheca* spp. jsou svým způsobem unikátní achlorofilní jednobuněčné organismy, tvořící kulovité, oválné až cylindrické buňky o velikosti 3 – 30 µm. Zralé buňky se rozmnožují nepohlavně, mění se ve sporangia vyplněná 2 – 20 sporama uspořádanými ve tvaru moruly. Stěna sporangia praská a nové buňky se uvolňují do vnějšího prostředí.² Z obecných biochemických vlastností rodu *Prototheca* lze jmenovat využití amoniových solí, glukózy, fruktózy a glycerolu, disacharidy ani nitráty nebývají metabolizovány, manóza, trehalóza a galaktóza a další bývají variabilní.^{2,3} Zdrojem organismů bývají nejčastěji prostředí, půda, voda, odpadní vody, stájové prostředí, krmiva, míza stromů, potraviny (kravské mléko, máslo, banány, bramborové slupky) a také živočichové (skot, jeleni, psi, netopýři).^{2,4} Infekce může mít exogenní nebo endogenní původ. K nakažení může dojít kontaktem se zdrojem původce, traumatickou inokulací nebo i s pomocí bodavého hmyzu. Je třeba však zdůraznit, že k propuknutí vlastního onemocnění je třeba oslabení makroorganismu různými imunosuprimujícími faktory jakými mohou být maligní bujení, transplantace orgánů, diabetes, dlouhodobá aplikace glukokortikoidů, AIDS.² Z medicínského hlediska jsou nejvýznamnější druhy *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca blaschkeae*

a *Prototheca zopfii*. Nejčastějšími formami onemocnění jsou kožní infekce, bursitis olecranu nebo diseminované systémové infekce, méně často bývají popisovány infekce gastrointestinálního, močopohlavního a respiračního traktu, vzácné bývají meningitidy. *Prototheca zopfii* genotyp 2 bývá ve veterinární sféře nejčastěji původcem mastitid skotu a kožních infekcí psů a koček.^{2,5} Z diagnostických postupů lze použít kulturační metody s využitím běžných půd jako je MPKA, Sabouraud Glucose Agar (SGA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), *Prototheca* Isolation Medium (PIM), CHROMagar Candida Medium. Inkubace se provádí při 30 a 37°C (tepelné optimum růstu je mezi 25 – 37°C) po dobu 48 – 72 hodin. *Prototheca stagnora* roste pouze při 30°C, nikoliv však při 37°C, na rozdíl od ostatních druhů.^{2,6,7} Z konfirmačních metod lze uvést nativní nebo barvený preparát z narostlých kultur (lactophenol cotton blue, calcofluor white), komerční biochemické testy (API 50C, Vitek 2 test, RapID Yeast Plus test), Polymerase Chain Reaction (PCR). Méně často jsou používány v diagnostice imunofluorescenční a histologické metody (PAS, Grindley fungus, Grocott modifikace Gomori methamine - silver).^{2,5,6} Léčba protoetekoz je poměrně složitá, dlouhodobá a nákladná vzhledem k rezistenci původců a toxicitě používaných antimikrobiálních látek. Literární prameny uvádí *in vitro* citlivosti vůči amphothericinu B, gentamicinu a ribostamycinu, rezistence je naopak popisována u griseofulvinu, 5-fluorocytosinu a amikacinu. *P. zopfii* je navíc citlivá vůči mikonazolu a rezistentní vůči klotrimazolu, *P. stagnora* bývá citlivá vůči klotrimazolu a rezistentní vůči mikonazolu, *P. wickerhamii* bývá citlivá vůči mikonazolu, flukonazolu

Obr. 2 – Porost *P. zopfii* na SGA (foto: autor)

a polymyxinu B. Citlivosti vůči tetracyklinu a itrakonazolu bývá variabilní. Rozdílů v citlivostech jednotlivých druhů rodu *Prototheca* bývá využíváno i při konfirmacích izolovaných kmenů.^{2,5,8} Údaje o prevalencích výskytu *Prototheca* spp. ve vzorcích mléka skotu se různí. Zatímco dánská autoři uvádějí prevalenci 0,17 %, italské údaje hovoří o 4,7 %, německé o 15,6 %.⁹⁻¹¹ Brazílská autoři hlásí prevalenci až 41,2 %.¹²

Cílem této práce bylo seznámit odbornou veřejnost s environmentálními původci mastitid skotu z rodu *Prototheca*, popsat techniku detekce těchto organismů, porovnat jejich citlivost vůči antimikrobiálním látkám a jejich prevalenci se světovými údaji.

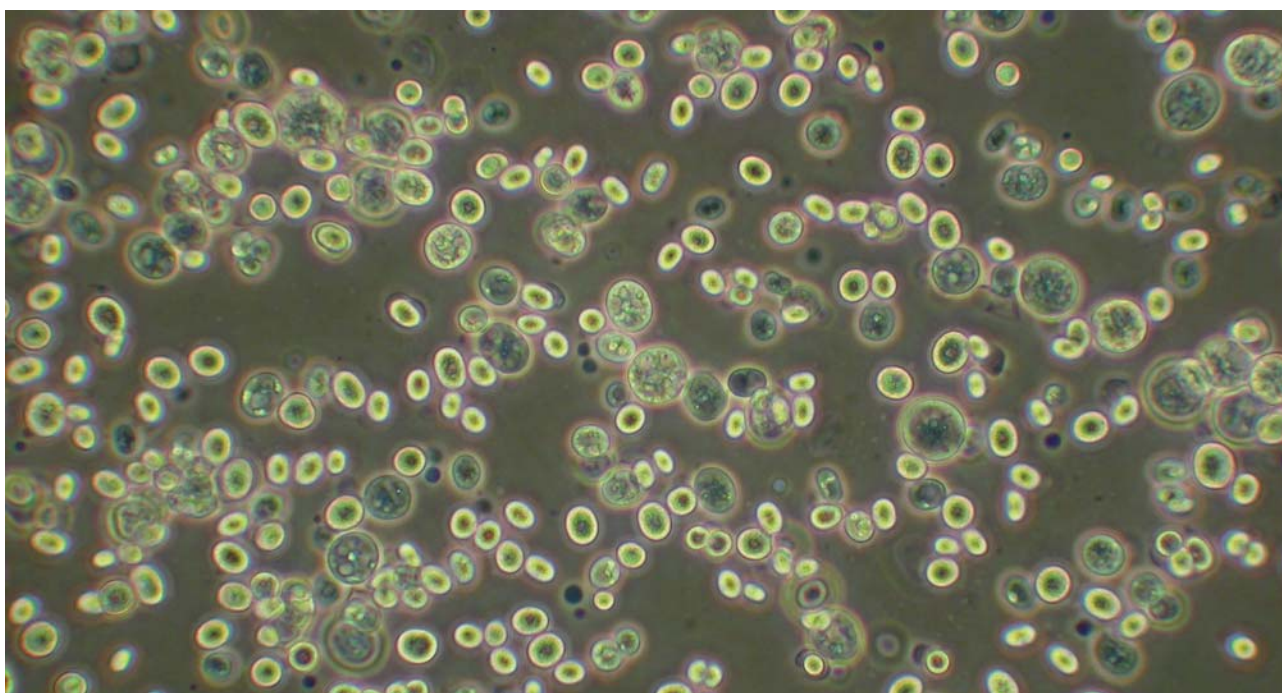
Materiál a metodika

Kultivace byla provedena standardními kultivačními metodami očkovaním vzorků na MPKA a SGA (vše Trios

s.r.o., Praha, ČR) a plotny byly inkubovány aerobně při $37\pm 1^\circ\text{C}$ a paralelně i při $30\pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 48 hodin. Izolace kultur byly provedeny stejným způsobem. V případě negativního nárůstu byla inkubace prodloužena na 72 hodin. Konfirmace porostů byla provedena s pomocí Nefermtestu 24 (Erba – Lachema, Brno, ČR). Inkubace Nefermtestů 24 byla provedena opět při $30\pm 1^\circ\text{C}$ a $37\pm 1^\circ\text{C}$ a výsledky byly odečítány po 48 a 96 hodinách. Citlivost vůči antibakteriálním látkám byla provedena diskovou difúzní metodou s použitím SGA (Trios s.r.o., Praha, ČR) a disků (Itest PLUS s.r.o., Hradec Králové, ČR; OXOID a.s., Brno, ČR). Inkubace byla provedena dle druhu při $30\pm 1^\circ\text{C}$ nebo $37\pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 48 hodin. Zóny byly hodnoceny podle platných standardů NCCLS. Validace Nefermtestu 24 byla provedena kmeny *P. zopfii* genotyp 1 a 2, SAG 2063 a 2021 (University Göttingen, Göttingen, Německo).

Výsledky

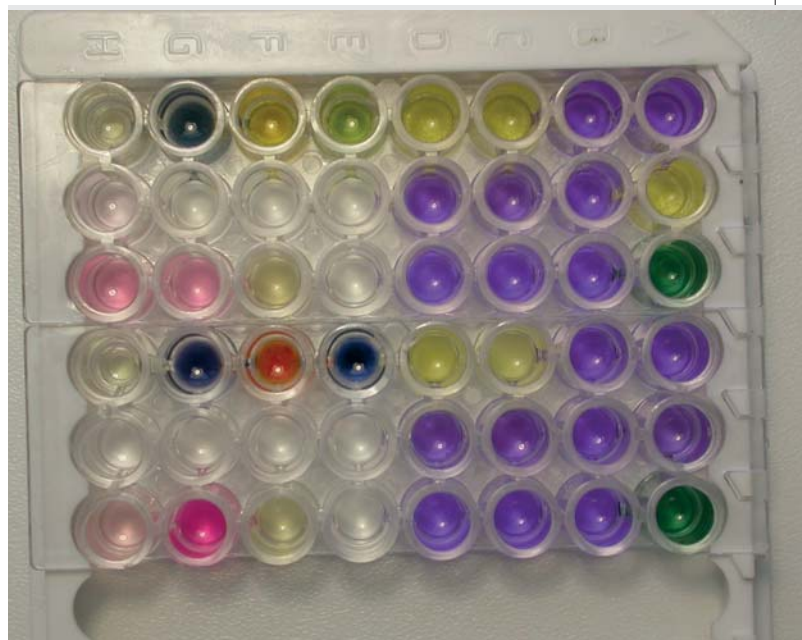
Od 1. 1. 2008 do 30. 10. 2012 bylo v SVÚ Olomouc vyšetřeno celkem 22 688 čtvrtových vzorků kravského mléka. V tomto období bylo izolováno a konfirmováno jako některý z druhů rodu *Prototheca* celkem 109 kmenů (prevalence 0,48 %). Podrobnější údaje o nálezech prototék, počtu vyšetřených vzorků a prevalencích v jednotlivých letech ukazuje tabulka 1. Prototěky velmi snadno narůstaly po 48 hodinách inkubace na MPKA jako matné drsné ploché šedavé kolonie s nepravidelnými okraji bez hemolýzy a s nevýrazným pachem spíše po médiu. Na SGA byly za stejných podmínek zaznamenávány opět ploché matné drsné neprůsvitné bělavé až nažloutle šedé kolonie s nepravidelnými okraji a nasládlým ceruminózním až ichorózním pachem. Prodloužením inkubace na čtyři až pět dní při stejných podmínkách došlo u *P.*

Obr. 3 – Nativní mikroskopický preparát z kultury *P. zopfii* na SGA (Zvětšení 400x, zástin, foto: autor)

zopfii k rozbrázdění až gyrifikaci povrchu kolonií a k vytvoření tzv. centrálního knoflíku (central button). U *P. stagnora* a *P. wickerhamii* byl povrch kolonií hladký. Velikost kolonií se po 48 hodinové inkubaci pohybovala na MPKA mezi 0,1 – 2,5 mm, na SGA mezi 0,5 – 4 mm. Vzhled porostů *P. zopfii* ukazují obrázky 1 a 2. V nativních preparátech zhotovených z porostů (zvětšení 400x) byly ve fázovém kontrastu patrné sférické až ovoidní buňky. Zralé buňky byly vyplněny sporami (viz obrázek 3). Všechny izolované kmeny byly potvrzeny biochemickými testy Nefermtest 24 (Erba – Lachema, Brno, ČR). Ve všech případech byla využívána glukóza, fruktóza, galaktóza a arginin. U *P. stagnora* byla navíc zkvašena sacharóza, u *P. wickerhamii* trehalóza. *P. zopfii* genotyp 1 naopak neutilizoval lyzin. Všechny kmeny metabolizovaly nitráty, nitrity a citrát. Rozdíly v utilizaci jednotlivých substrátů u dvou genotypů nejfrekventovanějšího druhu *P. zopfii* ve výše uvedených testech ukazuje obrázek 4. Biochemické vlastnosti medicínsky významných druhů prototék dokládá tabulka 2. Z antimikrobních látek bylo testováno 15 následujících substancí: nystatin, amphotericin B, pimarin, 5-fluorocytosin, itraconazol, ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, flukonazol, ekonazol, bifonazol, ciklopiroxolamin, vorikonazol, gentamicin a kolistin. Citlivost izolátů byla zaznamenána vůči amphotericinu B, ciklopiroxolaminu, itraconazolu, nystatinu, pimarinu, ekonazolu, ketokonazolu, mikonazolu, gentamicinu a kolistinu, zatímco u 5-fluorocytosinu, klotrimazolu, flukonazolu, vorikonazolu a bifonazolu byla ve všech případech zaznamenána rezistence. Procento našich izolátů citlivých k použitým antimikrobním látkám ukazuje tabulka 3. Obrázek 5 znázorňuje histologický řez mléčné žlázy postižené prototékovou mastitidou.

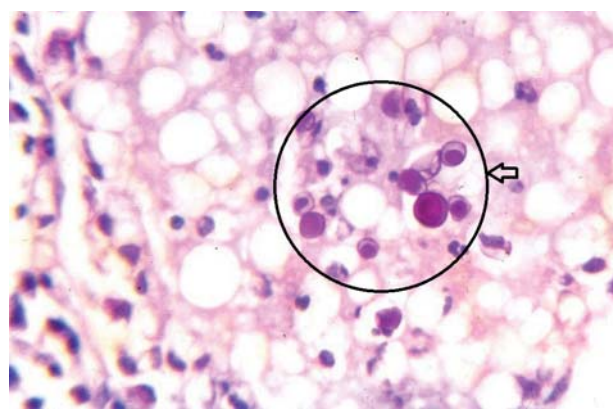
Diskuse

Tato práce potvrzuje výskyt zelených řas z rodu *Prototheca* jakožto původců mastitid skotu také v chovech skotu v České republice. Prevalence těchto organis-



Obr. 4 – Rozdíly v biochemické aktivitě prototék v Nefermtestu 24. Nahoře *P. zopfii* gen. 1, dole *P. zopfii* gen. 2 (foto: autor)

mů v našich podmínkách je srovnatelná se zeměmi, jako je například Dánsko (0,17 %), naopak velmi nízké jsou naše prevalence v porovnání s údaji italských a německých autorů (4,7 % a 15,6 %).⁹⁻¹¹ Je třeba však říci, že německí autoři využili v diagnostice kromě kultivačních technik i citlivějších metod detekce (ELISA). Extrémně vysoké jsou prevalence prototék, které uvádí autoři brazilští (41,2 %).¹² V tomto případě mohou prevalenci pozi-



Obr. 5 – Histologický řez mléčnou žlázou skotu s prototékovou mastitidou (Barveno H-E, zvětšeno 600x, foto: prof. MVDr. R. Halouzka, DrSc.)

Tab. 1 – Druhy a počty izolovaných kmenů prototék, jejich prevalence a počty vzorků kravského mléka vyšetřených na SVÚ Olomouc v letech 2008 – 2012

Rok	2008	2009	2010	2011	2012*	Celkem izolátů
Prototheca spp.	7	5		1		13
<i>P. zopfii</i> gen.1		12	28	14	19*	73
<i>P. zopfii</i> gen.2		5	2	1	13*	21
<i>P. stagnora</i>			1			1
<i>P. wickerhamii</i>		1				1
Celkem izolátů	7	23	31	16	32*	109
Počet vyš. vzorků	7897	3766	4605	3518	2902*	22688
Prevalence (%)	0,09	0,61	0,67	0,45	1,10*	0,48

*Údaje k 31.10. 2012

Tab. 2 – Diferenciace medicínsky významných řas z rodu *Prototheca*

Test	Druh	<i>P. stagnora</i>	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. zopfii</i> gen. 1	<i>P. zopfii</i> gen. 2	<i>P. blaschkeae</i>
Velikost buněk		7 – 14 µm	4 – 10 µm	11 – 30 µm	5-15 µm	5-15 µm
Tvar buněk		Sférické	Sférické	Sférické cylindrické	Sférické cylindrické	Sférické
Tvar kolonií		Ploché, hladké s hladkým okrajem	Vypouklé, hladké s hladkým okrajem	Ploché, drsné s nerovným okrajem a centrálním knoflíkem	Ploché, drsné s nerovným okrajem a centrálním knoflíkem	Ploché, hladké s nerovným okrajem a centrálním knoflíkem, bílé až krémové
Kapsula		+	-	-	-	-
Glycerol		+	+	+	+	-
Sacharóza		+	-	-	-	-
Trehalóza		-	+	-	-	-
Fruktóza		+	+	+	+	+
Galaktóza		+ po 96 hod.	+	+	+ po 96 hod.	+
Glukóza		+	+	+	+	+
Laktóza						-
Maltóza						
Arginin		+	+	+	+	-
Lyzin		+ po 96 hod.	+	-	+	-
NaCl tolerance				4%	6%	
pH tolerance				2,4-9,5	2,1-10,5	
Růst při 37° C		-	+	+	+	+
Výskyt				Kravíny a prasečáky	Kravíny a odpadní vody	
Původce mastitid skotu		-	+	+ experimentálně	+	+

Tab. 3 – Procento izolovaných kmenů prototék citlivých k testovaným antimikrobním látkám (období 2008 – 2012)

Druh	<i>Prototheca</i> spp.	<i>P. zopfii</i> gen.1	<i>P. zopfii</i> gen.2	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. stagnora</i>
Účinná látka					
Amphotericin B	30,77	53,97	6,67	100	100
Ciklopiroxolamin	100	92,06	100	100	0
Itrakonazol	30,77	15,87	0	100	0
Nystatin	100	100	100	100	100
Pimaricin	100	100	93,75	0	100
Ekonazol	0	78,57	0	100	0
Ketokonazol	0	0	0	100	0
Mikonazol	0	0	0	100	0
Gentamicin	100	78,57	N	N	N
Kolistin sulfát	N	100	N	N	N

N = nebyl testován

tivně ovlivňovat klimatické podmínky (vysoká vzdušná vlhkost a teplota), které mohou napomáhat množení původce v prostředí stáje, neboť prototéky je možno zařadit mezi tzv. environmentální původce mastitid. Je zajímavé, že v našich vzorcích se vyskytoval v čistých kulturách a v silné intenzitě především druh *P. zopfii*

genotyp 1 (73 izolátů), který dokonce převládá nad patogenním genotypem 2 (21 izolátů). Je možné se tedy domnívat, že i *P. zopfii* genotyp 1 nemusí být jen kontaminantou, nýbrž že i tento genotyp může vyvolávat mastitidy, nebo může být komplikujícím faktorem u mastitid jiného původu (mykoplazmové, virové, iritač-

ní atd.). Co se týká citlivostí našich izolátů prototék, je třeba poukázat na odchylky od publikovaných dat. V našem případě byla zaznamenána rezistence k 5-fluorocytosinu, zatímco literární údaje hovoří o citlivosti kmenů k tomuto antimykotiku. U *P. zopfii* byla v našem případě zaznamenána rezistence vůči mikonazolu, u *P. stagnora* rezistence vůči klotrimazolu a u *P. wickerhamii* pak rezistence vůči flukonazolu, přestože literární prameny uvádí u těchto antimikrobních látek citlivost.^{2,5,8} Za nejefektivnější z použitých antimikrobních látek můžeme považovat nystatin, jehož účinnost jsme zaznamenali v podmínkách in vitro u 100% testovaných kmenů.

Závěr

Tato publikace popisuje zelené řasy z rodu *Prototheca* jako sporadické (ojedinělé) původce mastitid skotu a prezentuje metody detekce a potvrzení těchto organismů, stejně tak i údaje o jejich prevalenci v ČR a citlivostech k antimikrobním látkám. Získaná data porovnává s literárními údaji, čímž splňuje účel této práce. Kromě zjištění, že naše chovy skotu mají nízkou prevalenci výskytu prototék, podařilo se zde také podchytyt i odchylky v citlivosti námi izolovaných kmenů k některým antimikrobním látkám v porovnání se zahraničními literárními prameny.

Poděkování

Děkuji panu profesoru MVDr. Romanu Halouzkovi, DrSc. za poskytnutí histologického obrázku prototékové mastitidy.

Literatura:

1. Ferrao-Filho, A. S., Kozlowsky-Suzuki, B. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine Drugs* 2011;9(12):2729-2772.
2. Lass-Flörl, C., Mayr, A. Human Protothecosis. *Clinical Microbiology* 2007;2(20):230-242.
3. Padhye, A.A., Baker, J.G., D'Amato, R.F. Rapid Identification of *Prototheca* Species by the API 20C System. *J Clin Microbiol* 1979;4(10):579-582.
4. Mettler, F. Generalized protothecosis in a fruit bat (*Pteropus lylei*). *Vet Pathol* 1975;12(2):118-124.
5. Roesler, U., Möller, A., Hensel, A., Baumann, D., Truyen, U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkae* sp. nov. *Int J System Evol Microbiol* 2006;56:1419-1425.
6. Jagielski, T. *Protothecosis* – etiologia, obraz kliniczny, terapie i diagnostika laboratoryjna. *Mikologia Lekarska* 2006;13(4):307-313.
7. Scott Pore, R. Selective Medium for the Isolation of *Prototheca*. *Applied Microbiol* 1973;4(26):648-649.
8. Casal, M. J., Gutierrez, J. Simple New Test for Rapid Differentiation of *Prototheca wickerhamii* from *Prototheca zopfii*. *J Clin Microbiol* 1983;4(18):992-993.
9. Aalbaek, B., Stenderup, J., Jensen, H.E., Valbak, J., Nylin, B., Huda, A. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 1994;102(6):451-6.
10. Buzzini, P., Turchetti, B., Facelli, R., Baudino, R., Cavarero, F., Mattalia, L., Mosso, P., Martini, A. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia* 2004;158(4):427-430.
11. Rösler, U., Hensel, A. Eradication of *Prototheca zopfii* infection in a dairy cattle herd. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2003;110(9):374-377.
12. Costa, E. O., Ribeiro A. R., Watanabe, E. T., Melville, P. A. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Zentralblatt Veterinärmedizin. Reihe B* 1998;45(2):66-71.

Adresa autora:

MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
Oddělení speciální mikrobiologie
Státní veterinární ústav Olomouc
Jakoubka ze Stříbra 1
779 00 Olomouc