

# Mykoplazmy jako czynnik wywołujący zapalenie wymienia u krów mlecznych

ELŻBIETA BEDNARKO-MŁYNARCZYK, JOANNA SZTEYN,  
AGNIESZKA WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, KATARZYNA LIEDTKE

Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn

Bednarko-Młynarczyk E., Szteyn J., Wiszniewska-Łaszczych A., Liedtke K.

## **Mycoplasma as an agent of mastitis in dairy cows**

### Summary

**Mycoplasma mastitis is one of the most pressing problems in herds of cows, especially in regions of increased milk production. Clinical signs in infected animals are not specific and the diagnosis of its causes should be based on laboratory testing. The classical scheme of investigation used in laboratories does not allow for their detection and should be extended to one of their methods of detection. Increased opportunities to detect mycoplasma are attained by proper storage of the milk samples.**

**Keywords: cattle, mastitis, Mycoplasma bovis**

Mykoplazmy (*Mycoplasma*) są najmniejszymi, wolno żyjącymi organizmami na świecie. Od innych bakterii odróżnia je brak zdolności do syntezy peptydoglikanu i jego prekursorów, które stanowią główne składniki budulcowe ściany komórkowej. Mykoplazmy są zatem całkowicie pozbawione jednej z podstawowych struktur morfologicznych większości *Procarryotae*. Brak sztywnej osłony czyni je niewrażliwymi na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, których działanie nakierowane jest na ścianę komórkową. Drobnoustroje te wykazują niezwykłą polimorficzność, gdyż ich komórki, otoczone tylko trójwarstwową, bogatą w sterole błoną cytoplazmatyczną, mogą przybierać kształt od kulistego poprzez gruszkowaty do form wydłużonych, rozgałęzionych albo spiralnie skręconych. Odrębność mykoplazm wyraża się ponadto zawartością obu typów kwasów nukleinowych. Kolejną cechą, dowodzącą morfologicznej wyjątkowości tych organizmów, jest posiadanie przez nie najmniejszego genomu ze wszystkich znanych do tej pory drobnoustrojów.

Dotychczas zidentyfikowano już ponad 200 gatunków mykoplazm. Opracowana przez francuskich badaczy krajowa sieć nadzoru epidemiologicznego – VIGIMYC (VIGIlance to MYCOplasmoses of ruminants) opisuje około 40 gatunków mykoplazm wyizolowanych od bydła domowego, owiec i kóz (8). Drobnoustroje mogą prowadzić do niepłodności i ronień. Bywają także przyczyną zapaleń macicy, opon mózgowych, płuc, rogówki, stawów oraz ucha środkowego (1, 17). Za najbardziej rozpowszechnione

patogeny wywołujące mykoplazmatyczne zapalenia wymienia u krów – *mastitis mycoplasmatica* – uważane są: *Mycoplasma (M.) alkalescens*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* i *M. canadense*, zaś gatunkiem najbardziej patogennym dla gruczołu mlekowego krów jest *M. bovis* (10, 14).

*M. bovis* została wyizolowana z chorego wymienia po raz pierwszy w 1961 r. w Stanach Zjednoczonych. Badania przeprowadzone od tego czasu dowodzą, iż mykoplazmy są coraz częściej diagnozowane jako czynnik etiologiczny stanów zapalnych gruczołu (11, 13, 18). W Grecji opisano przypadki klinicznej postaci *mastitis* u 219 krów, od których z 18 próbek mleka wyizolowano *M. bovis*. Wskaźnik zakażenia w stadzie wyniósł wówczas 8,2% (9). Zapalenia wymienia wywołane przez mykoplazmy występują także na innych kontynentach. W Meksyku ze stada liczącego 282 krowy pobrano 28 próbek mleka od podejrzanych o chorobę zwierząt. Z materiału biologicznego wyizolowano mykoplazmy. Następnie zwierzęta zakażone mykoplazmami poddano terapii farmakologicznej, która nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. W dodatku właściciel stada nie zdecydował się na podjęcie działań mających na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się patogenu. W wyniku zaniechań musiał ostatecznie wybrakować 177 sztuk bydła (12). Według danych szacunkowych Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych, zakażenie mykoplazmami w USA dotyczy 7,9% stad. Podstawą oceny występowania *mastitis mycoplasmatica* były wyniki badań próbek mleka

zbiorczego pobranego z 871 stad bydła mlecznego. Największy odsetek stad zakażonych mykoplazmami (9,4%) stwierdzono w regionach zachodnich Stanów Zjednoczonych (14, 16). Roczne straty ekonomiczne spowodowane przez *mastitis mycoplasmatica* zostały oszacowane w USA na ponad 100 milionów dolarów (13, 18, 25).

Mykoplazmy nie należą do bezwzględnych patogenów, są drobnoustrojami warunkowo chorobotwórczymi. Powszechnie występują na błonach śluzowych układu oddechowego i moczowo-płciowego u zdrowych krów oraz na skórze brodawek sutkowych (3). Pod wpływem usposabiających czynników, takich jak: nieodpowiednie warunki zoohigieniczne, nadmierne zagęszczenie zwierząt, błędy żywieniowe, wykazują działanie chorobotwórcze. Za czynniki sprzyjające zachorowaniu i szerzeniu mykoplazmoz wymienia uważa się wprowadzenie zakażonych sztuk do stada, kontakt personelu z zakażonymi zwierzętami, narażenie krów na sytuacje stresowe, nieprawidłowości w pozyskiwaniu mleka związane głównie z niedostateczną higieną doju (17, 25). Rękawice dojarzy, gumy strzykowe oraz powierzchnie innego sprzętu do dojenia są bardzo częstymi wektorami rozprzestrzeniania się choroby w stadzie (14, 25).

Najczęstszą drogą zakażenia gruczołu mlekowego mykoplazmami jest droga poprzez kanał strzykowy. Eksperymentalne zakażenie ćwiartki wymienia dawką 70 jtk mykoplazm wywołało *mastitis* (14). W okresie inkubacji choroby liczba komórek mykoplazm wydanych w mlekiem może osiągać wartość  $10^6$  jtk/ml. Maksymalna koncentracja mykoplazm w mleku chorych krów wyniosła do  $10^8$  jtk/ml (25). Droga laktogenna nie jest jedyną drogą zakażenia. Zostało dowiedzione, że mykoplazmy przenoszone są przez krew. Znane są przypadki zasiedlania gruczołu mlekowego drobnoustrojami pochodzącymi z innych, wcześniej zainfekowanych organów chorego zwierzęcia (14). Do zakażenia tymi patogenami może dojść również drogą kontaktu płciowego lub w trakcie sztucznego unasienniania (25). Możliwe jest też pionowe przenoszenie zarazka podczas porodu, przez wydzielinę z pochwy lub podczas ssania zanieczyszczonej siary lub mleka (17).

Do zakażenia może dojść w każdym wieku, a objawy kliniczne zapalenia wymienia mogą wystąpić przed osiągnięciem przez zwierzę dojrzałości płciowej. Opisano przypadek siedmiodobowego cielęcia, u którego zaobserwowano obrzęk, zaczerwienienie i bolesność brodawki sutkowej. Z wydzieliny chorej ćwiartki wymienia wyizolowano *M. bovigentialium* (22). Porównanie danych piśmiennictwa wskazuje, że przypadki *mastitis mycoplasmatica clinica* u zwierząt, które nie osiągnęły dojrzałości płciowej, zdarzają się znacznie rzadziej niż u krów będących w cyklu produkcyjnym. Do zakażenia dochodzi zarówno w czasie laktacji, jak i zasuszenia (17). Przebieg choroby bywa różny, począwszy od łagodnych aż do ciężkich przypadków.

Mykoplazmozę gruczołu mlekowego cechuje dość nagłe wystąpienie jej w stadzie. Chora ćwiartka wymienia jest zazwyczaj obrzękła, stwardniała i niebolesna (20). Spadek mleczności zaznacza się w większych ćwiartkach wymienia, a możliwe jest nawet szybkie obniżenie produkcji mleka do kilku mililitrów (27). Wydzielina gruczołu mlekowego może przyjąć brązowy kolor oraz konsystencję od wodnisto-ropnej do ropnej (17, 25). Początkowo zajęta zostaje jedna ćwiartka, a po kilku dniach pozostałe (7, 9, 27).

Opisano próby leczenia stanów zapalnych wymion wywołanych przez mykoplazmy. Najlepsze rezultaty dały fluorochinolony, których mechanizm działania polega na zaburzeniu syntezy DNA w jądrze komórkowym drobnoustrojów. Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały niską oporność mykoplazm na donofloksacyne, enrofloksacyne, marbofloksacyne (26). Równocześnie z leczeniem chorych sztuk ważne jest wprowadzenie w stadzie postępowania nie dopuszczającego do rozprzestrzeniania się choroby. Powinno ono uwzględniać izolację krów zakażonych, dojenie ich na końcu, regularną dezynfekcję stanowisk, korytarzy, zlewni, urządzeń udojowych i wymion. Oprócz wprowadzenia ścisłych rygorów higienicznych należy także ograniczyć przemieszczanie zwierząt (3, 19). Bardzo ważne w profilaktyce zakażeń jest postępowanie z mlekiem pozyskanym od zakażonych matek. Siara i mleko powinno zostać poddane obróbce termicznej przed skarmianiem cieląt. Stwierdzono, że ogrzanie mleka przez 2 minuty w temperaturze  $65^{\circ}\text{C}$  zabija *M. bovis* i *M. californicum*. Bardziej oporna na działanie wysokich temperatur jest *M. canadense* (6).

Zastosowanie chemioterapeutyków oraz wdrożenie działań prewencyjnych po wystąpieniu *mastitis mycoplasmatica* w stadzie nie zawsze przynoszą oczekiwane rezultaty, ponieważ osiągnięcie wydajności mlecznej porównywalnej do poziomu występującego przed mykoplazmozą wymienia może okazać się niemożliwe. Należy pamiętać, że ozdrowiałe krowy są w dalszym ciągu źródłem zanieczyszczenia środowiska mykoplazmami. Odnotowano przypadki rozsiewania *M. bovis* przez wiele lat (17). Najskuteczniejszym postępowaniem zapobiegającym rozprzestrzenianiu w stadzie mykoplazm jest brakowanie zakażonych zwierząt (14).

Opisane objawy kliniczne zapalenia wymienia nie są charakterystyczne wyłącznie dla mykoplazm. W celu prawidłowego rozpoznania choroby niezbędna jest jednoczesna diagnostyka laboratoryjna. Może ona wykorzystywać różne metody: badania hodowlane, serologiczne oraz techniki biologii molekularnej. Ze względu na to, że mykoplazmy nie wykazują wzrostu na podłożach używanych w standardowej procedurze izolacji patogenów z próbek mleka, częstość występowania *Mycoplasma species* w wielu krajach jest nieznaną. Ogólnie szacuje się, że czynniki etiologiczne klinicznych i podklinicznych postaci zapalenia wymienia krów nie są diagnozowane w ponad 30% przy-

padków choroby (24). Dlatego uzasadnione w określeniu skali problemu byłoby poszerzenie dotychczas stosowanego schematu badania hodowlanego o procedurę hodowli mykoplazm dla identyfikacji czynnika etiologicznego zapalenia wymienia. Niedocenione jest też postępowanie przy pobieraniu próbek mleka do badań, ponieważ dłuższe ich przechowywanie w temperaturach chłodzenia i mrożenia obniża początkową liczebność mykoplazm. Zapobiec temu zjawisku może dodatek glicerolu do próbek mleka, w stosunku 1 : 9 lub 3 : 7, który poprawi przeżywalność mykoplazm (4).

Do badań hodowlanych mogą być wykorzystane próbki mleka wymieniowego lub oborowego. Znane dotychczas schematy izolacji mykoplazm różnią się doborem podłoża oraz warunkami inkubacji (6, 20, 23). Brak jest standardowej procedury wykorzystywanej w tych badaniach. Najczęściej do hodowli i izolacji tych drobnoustrojów wykorzystywane jest podłoże Hayflicka (9, 10, 19). Richard i wsp. (21) zalecają, aby równocześnie wykonać dwa posiewy – na zmodyfikowany agar Hayflicka 100  $\mu$ l materiału, a na wzbogacony bulion Hayflicka 2 ml. Podłoże stałe należy inkubować przez 10 dni, a płynne przez 2 dni w temperaturze 37°C w atmosferze 10% CO<sub>2</sub>. Następnie hodowlę bulionową przesiać na zmodyfikowany agar Hayflicka w celu wstępnej izolacji mykoplazm. Cechy fenotypowe bakterii z rodzaju *Mycoplasma* na agarze Hayflicka są charakterystyczne i kolonie wyglądem przypominają sadzone jajo (13, 14).

Uzyskanie informacji na temat gatunku mykoplazm wymaga określenia cech metabolicznych. Do tego celu służą testy: fermentacji glukozy, hydrolizy argininy i mocznika (25).

Testem wykazującą większą specyficzność niż badanie biochemiczne w identyfikacji gatunku mykoplazm jest immunofluorescencja pośrednia. Pojedyncze kolonie wycięte z agaru inkubuje się z surowicami zwierząt i przeciwciałami oznakowanymi fluoresceiną. Wyniki tej reakcji obserwuje się przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego (23).

W wykrywaniu obecności przeciwciał w próbkach mleka najczęściej wykorzystywaną metodą jest immunoenzymatyczny test Elisa. Należy jednak pamiętać, że obecność przeciwciał w próbkach mleka nie musi świadczyć o *mastitis mycoplasmatica*. Przeciwciała mogą występować przy stanach zapalnych toczących się w różnych częściach organizmu, dlatego jedynie dodatnie wyniki testów Elisa, którym towarzyszą objawy kliniczne mykoplazmatycznego zapalenia wymienia, stanowią podstawę do rozpoznania schorzenia.

Wielu autorów podkreśla wyższość technik biologii molekularnej nad badaniami hodowlanymi czy serologicznymi (17, 24). Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) znalazła zastosowanie do wykrywania mykoplazm w materiale biologicznym. Dzięki zastosowaniu real-time PCR możliwe jest wykrycie w mleku bardzo małej liczby bakterii – 10-30 jtk/ml (5). Meto-

da ta wydaje się szczególnie przydatna przy wykazaniu obecności mykoplazm w mleku zbiorczym, w którym koncentracja tych drobnoustrojów jest znacznie mniejsza niż w mleku wymieniowym. Technika PCR pozwala także na identyfikację blisko spokrewnionych *M. bovis* i *M. agalactiae* (2). Kolejną zaletą badań molekularnych jest możliwość wykorzystania zamrożonych próbek mleka i przechowywania ich przez dłuższy czas. Mimo że przechowywanie próbek w ujemnych temperaturach znacznie zmniejsza żywotność mykoplazm, materiał genetyczny jest nadal obecny w próbce.

Występowanie wśród krów zapaleń wymienia wywołanych przez mykoplazmy jest coraz częstsze (11, 20). W niektórych krajach skala problemu została już rozpoznana (8). W Polsce brak jest wyników badań określających częstotliwość występowania przypadków mykoplazmatycznego zapalenia wymienia. Wnikliwe zapoznanie się z właściwościami drobnoustroju i prawidłowo przeprowadzana diagnostyka w stadach w kierunku występowania tych bakterii w mleku pozwoliłyby w przyszłości na ograniczenie występowania zakażeń tym patogenem i zmniejszenia strat ekonomicznych z tego tytułu.

## Piśmiennictwo

1. Ayling R. D., Baker S. E., Nicholas R. A. J.: Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.* 2000, 146, 745-747.
2. Bashiruddin J. B., Frey J., Königsson M. H., Johansson K. E., Hotzel H., Diller R., de Santis P., Botelho A., Ayling R. D., Robin A. J., Nicholas R. A. J., Thiaucourt F., Sachse K.: Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *Vet. Jour.* 2005, 169, 268-275.
3. Boddie R. L., Owens W. E., Ray C. H., Nickerson S. C., Boddie N. T.: Germicidal Activities of Representatives of Five Different Teat Dip Classes Against Three Bovine *Mycoplasma* Species Using a Modified Excised Teat Mode. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 1909-1912.
4. Boonyyatra S., Fox L. K., Besler T. E., Sawant A., Gay J. M.: Effects of storage methods on the recovery *Mycoplasma* species from milk samples. *Vet. Microbiol.* 2010, 144, 210-213.
5. Boonyyatra S., Fox L. K., Besler T. E., Sawant A., Gay J. M., Raviv Z.: A PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary *Mycoplasma* species causing mastitis. *J. Dairy Sci.* 2012, 95, 196-205.
6. Butler J. A., Sickles S. A., Johanns C. J., Rosenbusch R. F.: Pasteurization of Discard *Mycoplasma* Mastitic Milk Used to Feed Calves: Thermal Effects on Various *Mycoplasma*. *J. Dairy Sci.* 2000, 83, 2285-2288.
7. Byrne W., Mc Cormack R., Markey B.: Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Vet. Rec.* 2005, 156, 767-771.
8. Chazel M., Tardy F., Le Grand D., Calavas D., Poumarat F.: *Mycoplasmas* of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet. Res.* 2010, 6.
9. Filioussis G., Christodoulouopoulos G., Thatcher A., Petridou V., Bourtzis-Chatzopoulou E.: Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. *Vet. J.* 2007, 173, 217-220.
10. Fox L. K., Kirk J. H., Britten A.: *Mycoplasma* Mastitis: A Review of Transmission and Control. *J. Vet. Med.* 2005, 52, 153-160.
11. Higuchi H., Iwano H., Kawai K., Ohta T., Obayashi T., Hirose K., Ito N., Yokota H., Tamura Y., Nagahata H.: A simplified PCR assay for fast and easy *Mycoplasma* mastitis screening in dairy cattle. *J. Vet. Sci.* 2011, 2, 191-193.
12. Infante-Martínez F., Aguado J., Eduard-Jasper D.: Mastitis outbreak due to *Mycoplasma californicum* and *Mycoplasma canadense* in a commercial dairy in the state of Jalisco, Mexico. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 1999, 41, 117-120.

13. *Karahan M., Kalin R., Atil E., Çetinkaya B.*: Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. *Vet. Rec.* 2010, 166, 827-829.
  14. *Kauf A. C. W., Rosenbusch R. F., Paape M. J., Bannerman D. D.*: Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 3336-3348.
  15. *Khan L. A., Loria G. A., Ramirez A. S., Nicholas R. A. J., Miles R. J., Fielder M. D.*: Biochemical characterisation of some non fermenting, non arginine hydrolysing mycoplasmas of ruminants. *Vet. Microbiol.* 2005, 109, 129-134.
  16. *Mausell F. P.*: *Mycoplasma bovis* Infection of dairy calves. *Praca dokt.*, University of Florida 2007.
  17. *Mausell F. P., Woolums A. R., Francoz D., Rosenbusch R. F., Step D. L., Wilson D. J., Janzen E. D.*: *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 2011, 25, 772-783.
  18. *Nicholas R. A. J., Ayling R. D.*: *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* 2003, 74, 105-112.
  19. *Punyapornwithaya V., Fox L. K., Hancock D. D., Gay J. M., Alldredge J. R.*: Association between an outbreak strain causing mycoplasma bovis mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: A case study from Idaho, USA. *Prev. Vet. Med.* 2010, 93, 66-70.
  20. *Radaelli E., Castiglioni V., Losa M., Benedetti V., Piccinini R., Nicholas R. A., Scanziani E., Luini M.*: Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a North Italian herd. *Res. Vet. Sci.* 2011, 2, 251-253.
  21. *Richard G. M., Riekerink O., Barkema H. W., Veenstra S., Poole D. E., Dingwell R. T., Keefe G. P.*: Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can. Vet. J.* 2006, 47, 567-572.
  22. *Roy J. P., Francoz D., Labrecque O.*: Mastitis in a 7-week old calf caused by *Mycoplasma bovigenitalium*. *Vet. J.* 2008, 176, 103-104.
  23. *Sachse K., Salam H. S. H., Roland Diller R., Schubert E., Hoffmann B., Hotzel H.*: Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet. J.* 2010, 186, 299-303.
  24. *Taponen S., Salmikivi L., Simojoki H., Koskinen M. T., Pyörälä S.*: Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.* 2009, 92, 2610-2617.
  25. *Tenke M.*: Examination of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Praca dokt.*, Szent Istvan University, Faculty of Veterinary Science 2005.
  26. *Thomas A., Nicolas C., Dizier J., Mainil J., Linden A.*: Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Vet. Rec.* 2003, 153, 428-431.
  27. *Wilson D. J., Skirpstunas R. T., Trujillo J. D., Cavender K. B., Bagley C. V., Harding R. L.*: Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 2007, 230, 1519-1523.
- Adres autora: lek. wet. Elżbieta Bednarko-Młynarczyk, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn; e-mail: elabednarko@wp.pl**