

Identificación de agentes micóticos en muestras de leche obtenidas de tanques de enfriamiento

Identification of mycotic agents in milk cooling tanks

Fecha de recepción: 12 de marzo de 2017
Fecha de aprobación: 24 de junio de 2017

Eliana Patricia Ortiz-Durán¹
René Alejandro Pérez-Romero²
Camilo Alberto Orozco-Sanabria³

DOI: <http://doi.org/10.19053/01228420.v14.n2.2017.7176>

Resumen

La presencia de hongos en la leche puede ser un indicador de deficiente higiene o de enfermedad en la glándula mamaria. Se planteó como objetivo identificar la presencia de agentes micóticos en leche; para ello, se tomaron, procesaron y analizaron 14 muestras de leche provenientes de los tanques de enfriamiento de nueve fincas con sistemas especializados de producción de leche, ubicadas, en su mayoría, en la Sabana de Bogotá, cuenca de trópico Alto. Las muestras fueron transportadas en elementos isotérmicos, entre 3-4 °C, al laboratorio del CNLM en Bogotá D.C., en donde se realizaron diluciones de 10⁻¹ con Lactato Ringer para la siembra de 1 mL en el sustrato cromógeno de placas Compact Dry YM, especiales para aislamiento de levaduras y mohos por formación de colonias identificables mediante escala cromática, avaladas por la AOAC. Al término de la incubación se evidenció formación de, al menos, dos colonias por placa, siendo más prevalentes las de color azul (78,6 %), compatibles con la levadura *Candida* spp., y en menor porcentaje colonias algodonosas, compatibles con *Aspergillus* spp. (14,3–28.6 %), lo cual confirma la presencia de hongos en todas las muestras de leche; en consecuencia, esta condición sugiere un factor que pone en riesgo la inocuidad y calidad de la leche y sus derivados.

Palabras clave: aspergillus; cándida; leche de vaca cruda; microbiología de alimentos. (Fuente: DeCS).

1 Universidad Nacional de Colombia (Bogotá D.C., Colombia). elportizdu@unal.edu.co.

2 Universidad Nacional de Colombia (Bogotá D.C., Colombia).

3 Ph. D. Universidad Nacional de Colombia (Bogotá D.C., Colombia). caorozcos@unal.edu.co.

Abstract

The presence of fungi in raw milk tank coolers could indicate either poor hygiene at primary level or disease in the mammary gland. This study aimed at identifying the presence of mycotic agents in milk. We analyzed 14 samples from cooling tanks, collected in nine farms with specialized milk production systems, located mainly in the savannah of Bogotá, high tropical basin. The samples were transported to the CNLM laboratory in Bogotá D.C., in isothermic elements, between 3-4 °C. At the laboratory, we made 10-1 dilutions with Ringer's lactate solution for the 1 mL planting in the chromogenic substrate of Compact Dry YM plates, approved by AOAC. This test is especially useful for isolating yeasts and molds through the formation of colonies identifiable by a chromatic scale, endorsed by the AOAC. At the end of the incubation period of the 14 processed samples, at least two colonies were formed per plaque: the blue colonies (78.6 %), compatible with the yeast *Candida* spp., and the less abundant cottony colonies (14.3 %-28.6 %), compatible with *Aspergillus* spp. This result confirms the presence of fungi in all milk samples, and consequently suggests a risk to the safety and quality of the milk and its derivatives.

Keywords: aspergillus; candida; food microbiology; milk. (Source: MeSH).

Como citar:

Ortiz-Durán EP., Pérez-Romero RA., Orozco-Sanabria CA. Identificación de agentes micóticos en muestras de leche obtenidas de tanques de enfriamiento. *Rev. Cien. Agri.* 2017; 14(2): 99-106.

I. Introducción

La producción de leche debe garantizar calidad e inocuidad al consumidor, por tanto, es de gran importancia asegurar su origen de animales sanos y condiciones de manejo adecuadas (1), como buenas prácticas ganaderas y de ordeño (BPG-BPO) (2). Bacterias, hongos y otro tipo de microorganismos, así como células somáticas en alto recuento, alteran la calidad microbiológica de la leche, afectando potencialmente la salud humana y los productos lácteos, por alteración de sus propiedades nutritivas y organolépticas (3). La leche de origen bovino y sus productos derivados pueden ser importantes fuentes de patógenos causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (4). La presencia de este tipo de patógenos en leche puede atribuirse al contacto directo de esta con fuentes contaminadas en el entorno de la finca o a la excreción directa de la ubre de un animal infectado (1).

La leche cruda proporciona nutrientes y condiciones necesarias para el crecimiento de diversas especies de hongos, cuya ocurrencia está influenciada por el estado fisiológico del animal, el clima, las condiciones de cría y alimentación (5, 6) y la deficiente limpieza y desinfección de los equipos de ordeño y los elementos de manejo de la leche cuando la descarga al tanque no es directa (7). Esta cadena de sucesos genera aumento significativo del recuento de células somáticas, el cual afectará la leche cruda y sus derivados, y por ello es factor de riesgo en la inocuidad del producto (7, 8). Los límites máximos recomendados de hongos en la leche ($1,0 \times 10^2$ UFC/mL) (8) deben ser tenidos en cuenta para determinar el riesgo de infección por consumo. Los hongos, como *Aspergillus* spp., pueden alterar la inocuidad de los alimentos por la presencia, principalmente, de micotoxinas producto de su metabolismo intermedio —la esterigmatocistina, producida por *A. nidulans*, tiene efectos hepatotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (9)— y en casos de mastitis micótica por aumento en recuento de células somáticas, cuyas enzimas, que perduran luego de la pasterización en los derivados de la leche, son responsables de fenómenos de

intolerancia digestiva, como manifestación frecuente (10). *Candida* no se encuentra descrita como contaminante común de la leche ni de sus derivados (11), por lo cual su presencia puede asociarse a condiciones de enfermedad como la mastitis (10).

La mastitis, tanto ambiental como contagiosa, se ha asociado más a agentes bacterianos (12). La mastitis de origen micótico es menos reportada; se estima entre el 1 % y el 12 % de todos los casos de mastitis; en ella prevalecen levaduras del género *Candida* y participan otras levaduras y mohos; generalmente se relaciona con la administración previa de antibióticos, con el uso de preparados antibióticos contaminados (13) y de jeringas u otros materiales en contacto con la glándula mamaria (14). Las infecciones intramamarias por levaduras suelen ser autolimitadas, con recuperación espontánea (13). Las infecciones con mohos del género *Aspergillus*, aunque son menos frecuentes, también se encuentran documentadas (15).

En Colombia no hay estudios de prevalencia de la mastitis de origen micótico, sin embargo, existe evidencia de un caso individual de mastitis por *C. albicans* (16); por ello, y teniendo en cuenta, por una parte, el potencial riesgo patógeno de estos microorganismos sobre la glándula mamaria, y, por otra, el efecto deletéreo que representa la presencia de ellos en la leche sobre la salud pública, este trabajo se propuso como objetivo determinar la presencia de hongos en la leche contenida en los tanques de almacenamiento de fincas en la región central del país, como una primera aproximación para establecer la necesidad de desarrollar estudios más detallados que analicen si hay relación de estos microorganismos con la presentación de mastitis en la zona de estudio.

II. Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo de tipo cualitativo, mediante un muestreo de selección intencionada bajo un modelo no probabilístico. Se tomaron muestras del tanque de enfriamiento en nueve fincas de sistema de producción de leche, en su mayoría ubicadas en la sabana de Bogotá (Tabla I), subregión del centro geográfico de Colombia,

en la parte sur del altiplano cundiboyacense, en la cordillera Oriental, a 2.600 m s.n.m. Estas fincas hacen parte del programa “Hato controlado, Hato seguro”, implementado por el Consejo Nacional de Calidad de la Leche y Prevención de la Mastitis (CNLM). Las razas en estas explotaciones lecheras especializadas son principalmente Holstein y Jersey, en hatos de 45 a 355 animales en producción. Las pérdidas anuales calculadas están entre 4.807.255 y 73.146.718 (pesos colombianos), ocasionadas por la prevalencia de mastitis en cada hato, variaciones en las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) indicadoras de calidad higiénica de la leche (2.000 a incontables), así como variaciones en el recuento de células somáticas RCS (117.000 a 1.678.000 ccs/mL) y los costos de tratamiento. La evaluación económica es autoría del CNLM, basada en los análisis económicos de autores varios en el mundo, y responde a la realidad económica de cada finca según el precio de pago y los litros entregados y los parámetros de calidad UFC y RCS. Todos los hatos que hacen parte del estudio presentan casos de mastitis clínica y subclínica determinados mediante California Mastitis Test (CMT) y RCS, según los informes individuales por finca que hacen parte de la base de datos del CNLM.

Se realizó seguimiento en un periodo de tres meses (septiembre a noviembre de 2016), con una a dos muestras por finca, según la frecuencia de visitas (mensual, cada dos meses u ocasional, definida por el acuerdo de acompañamiento experto entre el médico veterinario, el productor y el CNLM). Cada muestra de tanque se recolectó en frascos de tereftalato de polietileno con

tapa rosca de 60 mL de capacidad, sin adición de ningún tipo de conservante; se verificaron las condiciones de enfriamiento, medidas con termómetro de precisión electrónica integrado a cada tanque principal antes de realizar la toma de las respectivas muestras (rango de temperatura entre 3 °C y 4 °C); se transportaron en elementos isotérmicos o neveras portables con “pilas” de gel refrigerante hasta su procesamiento y análisis, llevados a cabo en el laboratorio de calidad de leche del CNLM, ubicado en la ciudad de Bogotá, localidad Usaquén.

Para el cultivo de las muestras se utilizaron placas Compact Dry YM avaladas por AOAC; se realizó una dilución de 10-1 a cada una de ellas, siguiendo indicaciones de la ficha técnica del producto, con 1 mL de leche y 9 mL de solución Ringer Lactato; se inoculó 1 mL de la preparación sobre los sustratos cromógenos de las placas, en donde las levaduras y los mohos manifiestan diferentes reacciones cromáticas, generando colonias de hongos de diferentes colores (17), así como placas control con 1 mL de solución Ringer Lactato. Luego de la siembra, se incubó cada muestra durante 3-7 días a una temperatura de 25 °C. La lectura de cada prueba se realizó con lámpara plana de luz blanca desde atrás de la placa, registrando como positivo el crecimiento de al menos una colonia de hongos, de acuerdo con el color de las placas, tal como se ilustra en la ficha técnica de Compact Dry YM, y se clasificó cada placa según los colores establecidos por el documento de certificación AOAC (Association Of Analytical Communities) para este producto (17).

Tabla I. Características de las fincas que participaron en el estudio.

Identificación del predio	Ubicación geográfica	Cantidad de muestras	Tipo de ordeño	Tipo de descarga de la leche	Frecuencia de entrega de la leche	Número de Tanques
Finca 1	Tocancipá - Cundinamarca	2	Mecánico	Tanque móvil	Diaria	2
Finca 2	Guasca - Cundinamarca	1	Mecánico	Tanque móvil	Diaria	2
Finca 3	Cajicá - Cundinamarca	2	Mecánico	Directa a tanque fijo	Diaria	1
Finca 4	Lenguazaque - Cundinamarca	1	Mecánico	Cantinas	Diaria	1

Finca 5	Tenjo - Cundinamarca	2	Mecánico	Cantinas	Diaria	1
Finca 6	Sopó - Cundinamarca	1	Mecánico	Cantinas	Diaria	1
Finca 7	Ubaté - Cundinamarca	2	Mecánico	Tanque móvil	Diaria	2
Finca 8	Mariquita - Tolima	1	Mecánico	Directa a tanque fijo	Diaria	1
Finca 9	Sopó - Cundinamarca	2	Mecánico	Directa a tanque fijo	Diaria	1

III. Resultados y discusión

En las 14 placas Compact Dry YM utilizadas para el estudio de las muestras hubo crecimiento de al menos 2 hasta incontables colonias de hongos, mientras que el resultado fue negativo para las placas control. A cinco tanques de diferentes fincas se les realizó muestreo en dos ocasiones diferentes, mientras que a los 4 restantes se les realizó un único muestreo (Tabla I). La Figura 1 muestra el cultivo de una de las muestras procesadas, en el cual se evidencia la presencia de colonias de cinco diferentes colores, permitiendo la identificación de diferentes géneros de levaduras y mohos. Todos los cultivos fueron positivos a al menos un tipo de hongo, en algunas muestras se observó el crecimiento de colonias de un solo color, y en otras se identificaron hasta cinco tipos de colonias.

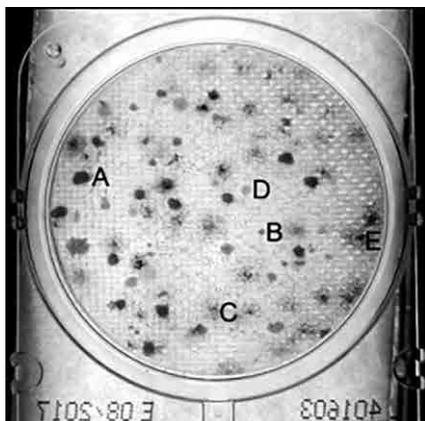


Fig. 1. Cultivo de una muestra procesada en placa Compact Dry YM, en la que se evidencia el crecimiento de seis colonias de levaduras y mohos, cada una de diferente color. A: Azul, B: Azul claro, C: Verde-marrón, D: Blanco y E: Negro.

La Tabla II muestra los posibles agentes micóticos presentes en las muestras de leche. De acuerdo con lo evidenciado, se puede concluir que la presencia de hongos del género *Candida* es la más prevalente, mientras que los hongos del género *Aspergillus* se aislaron con menor frecuencia.

Tabla II. Identificación del agente micótico* presente en las muestras, según el color de la colonia, tras el periodo de incubación.

Pruebas positivas		POSIBLES AGENTES MICÓTICOS
Número	Porcentaje	
11	78.6 %	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i>
8	57.1 %	<i>Candida albicans</i>
4	28.6 %	<i>Aspergillus nidulans</i>
4	28.6 %	<i>Candida tropicalis</i>
3	21.4 %	<i>Aspergillus clavatus</i>
2	14.3 %	<i>Aspergillus oryzae</i>
2	14.3 %	<i>Aspergillus niger</i>

* Se tienen en cuenta únicamente las especies de hongos relacionadas por su presencia reportada en la leche, ya que en el documento de certificación AOAC se incluyen especies de hongos asociados a diferentes tipos de alimentos.

Se identificaron microorganismos de los géneros *Candida* y *Aspergillus*. Las colonias azules se formaron en la mayoría de placas. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Aspergillus nidulans* son posibles especies relacionadas con el mayor porcentaje de pruebas positivas. En todas las muestras hubo formación

de colonias de color azul o azul claro, hallazgo sugerente de al menos un tipo de *Candida*, mientras que las colonias compatibles con *Aspergillus* son menos frecuentes. Según los colores y las especies relacionadas, se puede inferir que, como única especie generadora de color azul claro reportada por el laboratorio productor de las placas Compact Dry YM, *Candida albicans* es la más prevalente en cuanto a levaduras, y *Aspergillus nidulans* como la especie de moho más frecuente (Tabla II). Ninguna muestra pareada tuvo resultados exactamente iguales al primer muestreo.

Tanto el género *Candida*, como *Aspergillus* se han identificado como agentes causales de mastitis micótica (13, 15, 16, 18-23). Aunque es menos frecuente, la presentación de mastitis por *Aspergillus* se ha comprobado en casos clínicos sin respuesta satisfactoria a medicamentos antibióticos; esto, mediante el aislamiento y detección de hifas en preparaciones de KOH. Para el ejemplo citado se diagnosticaron cinco vacas con mastitis micótica, cuatro de las cuales fueron positivas a *A. fumigatus*, y una, a *A. nidulans* (15).

La positividad a hongos de las muestras de leche cruda de las granjas también podría atribuirse a pezoneras contaminadas, a carencia de higiene y de desinfección de pezones, a contaminación por operarios y a la presencia del hongo en el medioambiente o en materiales de desinfección (24). Pero, así mismo, las levaduras, como *Candida*, son oportunistas, y, como tales, estando presentes en el entorno natural del ganado (piel de la ubre, secreción del útero, las manos del ordeñador, las máquinas de ordeño, los instrumentos de tratamiento, el suelo, el alimento, el polvo, así como las mezclas de medicamentos y soluciones desinfectantes) también tienen el potencial de infectar a los animales del hato (23). Además, se sabe que circunstancias como la inadecuada higiene y la alta humedad ambiental son los mayores factores predisponentes para la infección fúngica de la glándula mamaria, así como el tratamiento prolongado con antibióticos (13, 24). La mastitis micótica se ha convertido en un problema creciente en animales y seres humanos, debido al amplio uso de antibióticos en la terapia de mastitis (24, 25); en consecuencia, es necesario

hacer una reflexión detallada sobre el manejo de estos medicamentos para el control de esta enfermedad, pues, bajo las condiciones actuales, el uso indiscriminado de agentes antibióticos en algunas granjas lecheras es cada vez más común, lo que podría generar alteraciones en la flora bacteriana de la ubre, favoreciendo la aparición de superinfecciones por hongos, tal como ocurre en otros sistemas, como el sistema digestivo (26).

Según Krukowski y colaboradores, en Polonia las especies más frecuentemente aisladas son del género *Candida*: *C. kefyr*, *C. cirferi* y *C. krusei* (27). En Brasil, en el año 2005, se reportó la presencia de *C. krusei* (44.5 %), *C. rugosa* (24.5 %) y *C. albicans* (8.9 %), como las más prevalentes en un muestreo de 37 rebaños lecheros (23). Así, queda claro que en algunos países la candidiasis de la ubre ha tomado especial relevancia; sin embargo, el interés por esta patología no solo radica en la pérdida económica que generan su impacto sobre el futuro en la producción del animal y los gastos de su tratamiento (24), también es necesario considerar el impacto sobre la salud pública que puede generar el consumo de leches contaminadas con estos microorganismos. Según Nedret y colaboradores, existe evidencia de la aparición de al menos doce casos de candidiasis en niños que consumieron leche contaminada con esta levadura (28). Lo anterior otorga mayor importancia a los resultados del estudio, pues la presencia de hongos no solo puede representar un creciente problema para la salud de los hatos (25), sino también un problema de salud pública poco estudiado, lo que impone la imperante necesidad de desarrollar trabajos que analicen la prevalencia de mastitis micótica en nuestro medio y el rol de estos agentes fúngicos como contaminantes directos de la leche almacenada.

IV. Conclusiones

En todas las muestras de leche analizadas se aisló, al menos, un género de hongos; esto determina, por una parte, un potencial riesgo para los eventuales consumidores de leche cruda, y, por otra, la posible alteración de los procesos de elaboración de los derivados lácteos. Las levaduras pueden desempeñar un papel importante en

el deterioro de la leche y sus subproductos, por favorecimiento de fermentaciones lácteas debido a varias de sus características fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la capacidad de utilizar lactosa o galactosa, alta actividad proteolítica o lipolítica, y su capacidad de crecer a bajas temperaturas y tolerar altas concentraciones de sal (6, 11). Aunque el proceso de pasteurización reduce considerablemente el riesgo de infección por consumo de leche contaminada, se debe tener en cuenta la población (principalmente en zonas rurales) que consume leche cruda o productos elaborados con esta (1). Así mismo, y aunque en este trabajo no es posible relacionar directamente la presencia de mohos y levaduras con los casos de mastitis en cada una de las fincas lecheras estudiadas, es necesario destacar que los géneros identificados en todas las muestras analizadas (*Candida* spp. y *Aspergillus* spp., específicamente *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*) se han identificado mediante pruebas moleculares más sensibles (m-PCR) como agentes causales de mastitis (25); por ende, es factible plantear la posibilidad de que en las granjas estudiadas se presenten casos de mastitis micóticas no tratadas y sin identificar.

En consecuencia, se sugiere realizar una segunda fase de este estudio en la que, en primera instancia, se analicen muestras tomadas directamente del pezón de animales con mastitis clínica y subclínica y de animales aparentemente sanos, con el fin de analizar la prevalencia de esta enfermedad en nuestro medio. En segunda instancia, y teniendo en cuenta que este estudio no determina la fuente exacta de contaminación de la leche en los tanques de enfriamiento, es imprescindible verificar si las condiciones de manejo del almacenamiento de la leche y demás factores ambientales y de prácticas de ordeño en las granjas son los más apropiadas para evitar alteraciones microbiológicas de la leche, como las evidenciadas con los resultados expuestos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Calidad de la Leche y Prevención de la Mastitis.

Referencias

- (1) Zumbado Gutiérrez L., Romero Zúñiga JJ. Conceptos sobre inocuidad en la producción primaria de leche. *Rev. Ciencias Veterinarias*. 2015; 33(2): 51-66. DOI: <http://dx.doi.org/10.15359/rcv.33-2.1>.
- (2) León L., Luis A., Mejía F. Aseguramiento de la inocuidad de leche cruda y pasteurizada en el departamento de Caldas. *Agronomía Colombiana*. 2016; 34: 984-989. DOI: <http://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58203>.
- (3) Rojas Ronquillo R., Cruz Bautista E., Daniel Rentería IC., Lammoglia Villagómez MA. Determinación de la calidad microbiológica de la leche cruda de vaca durante la temporada invernal en Tuxpan, Veracruz. *Casos y Experiencias Compartidas en las Ciencias*. 2014: 1107-1111.
- (4) Guerrero JA. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. *Protocolo de vigilancia en salud pública*. Inst Nac Salud. 2016; 3-4.
- (5) Delavenne E., Mounier J., Asmani K., Jany JL., Barbier G., Le Blay G. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int J Food Microbiol*. 2011; 151(2): 247-51. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.029>.
- (6) Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford TP., Ross RP., Fitzgerald GF., et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37(5): 664-698. DOI: <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
- (7) SENA, CNLM, Guía técnica para la obtención de leche de calidad. 2a ed., Colombia, septiembre 2007.
- (8) Luigi T., Rojas L., Valbuena O. Evaluación de la calidad higienicosanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela. *Salus*. 2013; 17(1): 35-50.
- (9) Gil A. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. *Tratado de Nutrición*. Ed. Médica Panamericana, Jun 30, 2010.
- (10) Mhone TA., Matope G., Saidi PT. Detection of salmonella spp., *Candida albicans*, *Aspergillus* spp., and antimicrobial residues in raw and processed cow milk from selected smallholder farms of Zimbabwe. *Vet Med Int*. 2012. DOI: <http://doi.org/10.1155/2012/301902>.
- (11) Orberá Ratón TM. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Rev Cubana Salud Pública*. 2004; 30(3).
- (12) Rodríguez V., Calderón A, Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Rev Colomb Ciencias Pecu*. 2008; 21(4): 582-591.
- (13) Krukowski H., Saba L. Bovine mycotic mastitis. *Folia Vet*. 2003; 47: 3-7.
- (14) Zaragoza CS., Olivares RAC., Watty AED., Moctezuma AP., Tanaca LV. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev Iberoam Micol*. 2011; 28(2): 79-82. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.002>.
- (15) Schällibaum M., Nicolet J., König H. *Aspergillus nidulans* and *aspergillus fumigatus* as causal agents of bovine mastitis. *Med Mycol*. 1980; 18(1): 33-38. DOI: <http://doi.org/10.1080/00362178085380071>.

- (16) Ramírez NF. Mastitis por *Candida* sp. en bovinos. *Rev Colomb Ciencias Pecu.* 1997; 10(2): 100-103.
- (17) Mizouchi S., Nelson M. Evaluation of Compact Dry YM: Matrix Extension, AOAC® Performance TestedSM número de certificación 100401. Aprobado en noviembre de 2015.
- (18) Krukowski H., Tietze M., Majewski T., Różanski P. Mycotic mastitis in cows. *Med Weter.* 2001; 150(1): 5-7.
- (19) Pachauri S., Varshney P., Dash SK., Gupta MK. Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. *Vet World.* 2013; 6(7): 393-395. DOI: <http://doi.org/10.5455/vetworld.2013.393-395>.
- (20) Dworecka-Kaszak B., Krutkiewicz A., Szopa D., Kleczkowski M., Biegańska M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *ScientificWorld Journal.* 2012; 196347. DOI: <http://doi.org/10.1100/2012/196347>.
- (21) Spanamberg A., Sanches EMC., Santurio JM., Ferreiro L. Mycotic mastitis in ruminants caused by yeasts. *Cienc Rural.* 2009; 39(1): 282-290. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000045>.
- (22) Sartori LCA., Santos RC., Marin JM. Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arq. Bras. Med. Vet.* 2014; 66(5): 1615-1617. DOI: <http://doi.org/10.1590/1678-7576>.
- (23) De Casia Dos Santos R., Marin JM. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia.* 2005; 159(2): 251-253. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11046-004-2229-2>.
- (24) Dubie T., Sisay T., Gebru M., Muktar Y. An Insight Review on the Role of Fungi in Mastitis of Dairy Animals and Its Economical Importance. *J Vet Sci Photon.* 2015; 116: 440-445.
- (25) Khaled A., Abd ER. New approach in diagnosis and treatment of Bovine Mycotic Mastitis in Egypt. *African J Microbiol Res.* 2011; 5(31): 5725-5732.
- (26) Quera R., Quigley EMM., Madrid AM. Sobrecrecimiento bacteriano intestinal, Small intestinal bacterial overgrowth. *Rev Méd Chile.* 2005; 133: 1361-1370. DOI: <http://doi.org/10.4067/S0034-98872005001100013>.
- (27) Krukowski H., Lisowski A., Różański P., Skórka A. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. *Pol J Vet Sci.* 2006; 9(3): 181-184.
- (28) Nedret K., A, Kocagöz S., Erdem F., Gündüz Z. Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. *Mycoses.* 2002; 45(11-12): 470-475.