

総説

## 臨床型乳房炎由来菌のバイオフィーム形成能の検出と病原性の実態

山下祐輔、小千田圭吾、酒詰史子、山中俊嗣、牧野康太郎、中田理美、  
下平敏之、丹 倫枝、小林玲欧那、吉田 隆、角田 浩

上川北農業共済組合

〒 095-0044 北海道士別市東山 3343-2

### 【要約】

バイオフィーム (BF) は慢性あるいは難治性感染症に関わっていると考えられているが、国内の産業動物の分野における報告は少ない。今回臨床型乳房炎罹患分房の乳汁から分離されたブドウ球菌属 (*Staphylococcus aureus*:SA, *Coagulase Negative Staphylococci*:CNS)、レンサ球菌属 (*Streptococcus uberis*:SU, *Streptococcus dysgalactiae*:SD, *Other streptococci*:OS)、腸球菌 (*Enterococcus spp.*:Ent)、計 382 株の BF 形成能、薬剤感受性および病原性について調査を行った。BF 形成能の検出にはコンゴレッド培地 (CRA) を用い、黒色コロニーを形成したものを BF 形成株 (BF+ 株)、赤色あるいは透明コロニーを形成したものを BF 非形成株 (BF- 株) とした。薬剤感受性の調査にはディスク法を、病原性の調査には、発症後翌月の牛群検定成績の体細胞リニアスコア (LS) を用いて、BF+ 株と BF- 株間で菌種ごとに比較した。分離された 382 株のうち BF+ 株は SA9/80 (11.3%)、CNS23/90 (25.6%)、SU65/68 (95.6%)、SD35/45 (77.8%)、OS53/88 (60.2%)、Ent10/11 (90.9%) であった。薬剤感受性試験では、SA のペニシリンとエリスロマイシンを除き、BF+ 株と BF- 株との間で感受性率に有意な差は認められなかった。また発症翌月の LS は、いずれの菌種においても BF+ 株と BF- 株の間で有意な差は認められなかった。本調査から国内の臨床型乳房炎由来菌の一部は BF 形成能を有する事がわかった。一方薬剤感受性および病原性については、BF が *in vitro* と *in vivo* での薬剤感受性の不一致の要因とも言われていること、また慢性乳房炎の科学的指標が確立されていないことなどから、本調査に用いた方法では BF 形成下での薬剤感受性や病原性について正しく評価できていない可能性も示唆され、本調査の結果の解釈については慎重にならなければならない。

**キーワード:** バイオフィーム、コンゴレッド培地、牛臨床型乳房炎、慢性感染症、薬剤感受性

### 【はじめに】

バイオフィーム (以下 BF) とは、微生物が自ら産生した高分子基質に包まれ、生体、非生体問わず、その表面に接着した集合体のことである [7]。BF を形成することにより抗生物質や生体の免疫機構などから身を守ることができるため、医療分野では、古くから医療器具関連感染症 (device related infections:DRIs) [17,

26]、嚢胞性繊維症などの難治性感染症の原因として注目され [29]、今なおその詳細なメカニズム解明のために研究が進められている。近年、動物の感染症由来の細菌からも BF 形成菌が複数発見されており [31, 36]、特に牛の乳房炎由来の細菌も BF を形成し、難治性乳房炎の原因の一つとして注目されている [12, 14, 15, 18, 35, 38, 45]。しかし、国内における乳牛の臨床型乳房炎由来菌の BF 形成能についての報告は少ない。今回、当診療所管内で発生した臨床型乳房炎由来細菌の BF 形成能、薬剤感受性、

受理: 2016年10月13日

病原性についての調査結果と近年盛んに行われているBFに関する報告とを合わせて、産業動物獣医療に関わる獣医師がBF形成菌による乳房炎とどう向き合っていくべきかを考えていきたい。

### 【BFとは？】

#### BFの形成

生体においてBFは、BF形成菌が生体組織の表面に接着(adhesion)し、集合(aggregation)、成熟(maturation)することで形成される。成熟したBF内で増殖した細菌の代謝活動で発生した老廃物により環境が悪化すると、BFの一部が破壊され、遊離菌(planktonic cell)として離脱(dispersal)し、異なる場所に接着し感染を広げることがわかっている[5, 13]。

#### BFの構成成分とBF形成能の検出

BFは微生物が作る細胞外多糖(Exopolysaccharide: 以下EPS)、蛋白質、eDNAを構成成分とするが、多くの細菌でEPSがBFの重要な構成成分であると言われている[13]。EPSは微生物が生成するslimeとして発見され、ChristensenらによりDRIsの主要な原因菌である*S. epidermidis*によるslime形成を定性的に検査する方法(Tube Method: 以下TM)が開発された[5]。しかし、TMでは、BF形成能の弱い微生物を検出しづらとし、Freemanらによりコンゴレッド培地(Congo Red Agar: 以下CRA)を用いたよ

り簡便で感度の高いslime形成能の定性的検査方法が開発された[16]。その間Christensenらは96ウェルのマイクロタイタープレートと分光光度計を用いたBF形成の定量的検査方法(以下MP法)を開発した[6]。その後、多くの研究者によりCRA法やMP法に改良が加えられ[12, 15, 20, 28]、PCRによる遺伝子解析もあわせることによって微生物のBF関連遺伝子(*icaADBC*、*bap*など)の発見につながった[3, 8-10, 18, 35, 37, 44]。ここでMP法は実際にBF形成を検出しているが、CRA法はBFの主成分であるslimeの形成を検出している点に注意されたい。

### 【当診療所管内で発生した臨床型乳房炎由来菌のBF形成能】

#### 臨床現場で応用可能なBFの検出方法

前述したBF形成能検査の中で、臨床現場において簡便かつ低コストで実施可能な検査方法は分光光度計などの高額機器を必要としないCRA法である。牛の乳房炎由来菌でCRA法を用いてBF形成能を見た報告は複数ある(表1)。そこで筆者らも、CRA法を用いて当診療所管内で発生した臨床型乳房炎由来菌のBF形成能について調査を行った。

#### 材料と方法

平成28年2月から8月に管内で発生した臨床型乳房炎のうち、細菌分離培養検査および薬剤感受性試験を行った427分房のデータを用い

表1 CRA法を用いてBF形成能を検出した研究

| 著者                            | 年代   | 菌種および検体数   | BF形成能検査             | 結果  |
|-------------------------------|------|--|---------------------|---|
| Dubravka et al(12)            | 2010 | 潜在型および臨床型乳房炎由来の黄色ブドウ球菌 70株                                       | CRA法<br>MP法         | CRA法でBF形成能あり 8/70(11.42%)<br>MP法で強いBF形成能 9/70(12.86%) 中程度 21/70(30%)<br>弱いBF形成能 40/70(57.14%)   |
| Baselga et al(2)              | 1993 | 牛乳房炎由来黄色ブドウ球菌 92株  | CRA法                | BF形成能あり 11/92(12%)  |
| Castelani et al(3)            | 2014 | 牛乳房炎由来黄色ブドウ球菌 未経産 83株 初産および経産27株                                 | CRA法<br>PCR         | CRA法でBF形成能あり 未経産 52/83(62.7%) 初産および経産9/27(33.3%)<br>PCRでica遺伝子陽性 icaA 未経産 82/83(98.8%) 初産および経産26/27(96.3%)<br>icaD 未経産 83/83(100%) 初産および経産27/27(100%) |
| Melo et al(28)                | 2013 | 潜在型乳房炎由来黄色ブドウ球菌 94株  | CRA法<br>MP法<br>PCR  | CRA法でBF形成能あり 80/94(85%)<br>MP法でBF形成能あり 93/94(98.9%)<br>PCRでicaAD遺伝子陽性 90/94(95%)<br>CRA法でBF形成能がある株は全てicaAD陽性  |
| Turkylmaz and Eskiizmirli(36) | 2006 | 様々な動物から採取した コアグラールゼ陽性ブドウ球菌(CoPS) 90株<br>コアグラールゼ陰性ブドウ球菌(CoNS) 90株 | CRA法<br>MP法<br>TM   | CRA法でBF形成能あり CoPS 70/90(77.7%) CoNS 40/90(44.4%)<br>MP法でBF形成能あり CoPS 67/90(74.4%) CoNS 33/90(36.6%)<br>TMでBF形成能あり CoPS 60/90(66.6%) CoNS(34.4%)       |
| He et al(18)                  | 2014 | 牛潜在型乳房炎由来黄色ブドウ球菌 102株  | CRA法<br>MP法<br>PCR  | CRA法でBF形成能あり 80/102(78.4%)<br>MP法でBF形成能あり 44/102(43.1%)<br>中国においてBF形成に最も重要とされる遺伝子は rbf StgB icaAD   |
| Vasudevan et al(37)           | 2003 | 牛乳房炎由来黄色ブドウ球菌 35株  | CRA法<br>MP法<br>PCR法 | CRA法でBF形成能あり 32/35(91.4%)<br>MP法でBF形成能あり 24/35(68.6%)<br>PCRでicaAD遺伝子陽性 35/35(100%)   |

た。本調査の流れを図1に示す。細菌分離培養は罹患分房から無菌的に採取した乳汁を5%羊血液寒天培地で37℃ 24時間好気的に培養し、コロニーの形状、溶血性、種々の生化学的検査により菌種の同定を行った。本調査は、過去の報告からCRA法でslime形成能が判定可能な、*Staphylococcus aureus* (SA)、*Coagulase Negative Staphylococci* (CNS) [2, 3, 12, 18, 28, 36, 37]、*Other Streptococci* (OS)を対象とした[30]。OSはさらに草場らの方法[22]を用いて*Streptococcus uberis* (SU)、*Streptococcus dysgalactiae* (SD)、*Enterococcus* spp. (Ent)、*Other Streptococci* (OS)に分類した。分離同定後、1コロニーを釣菌しFreemanらの方法[16]をもとに作成したCRAに塗抹後、37℃ 24時間好気的に培養し、形成されたコロニーの色調をVery Black (VB)、Black (B)、Almost Black (AB)、Bordeaux (Brd)、Red (R)、Very Red (VR)の6段階比色で判定した[1, 44]。VB、B、ABをslime形成陽性すなわちBF形成能陽性(BF+)、Brd、R、VRをslime形成陰性すなわちBF形成能陰性(BF-)とした。また同時にSA、CNSのコロニーをミュー

ラーヒントン寒天培地に、SU、SD、Ent、OSのコロニーは5%羊血液寒天培地にそれぞれ塗抹し、感受性ディスク(BDセンシ・ディスク、ベクトン・ディッキンソン)を用いてペニシリン、カナマイシン、オキシテトラサイクリン、エリスロマイシン、セファゾリン、セフロキシムについて薬剤感受性試験を行った。結果の解釈はCLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testに従って行い、感性(S)以上を感受性ありとした。CLSIに基準がない菌種と抗生物質の組み合わせでは、明瞭な阻止円を形成したものを感受性ありとした。

BFによる病原性の違いを検証するために、牛群検定情報を用いて発症翌月の体細胞リニアスコア(LS)を菌種別にBF+株とBF-株と比較した。解析には発症分房が1分房のみで、発症から1ヶ月以内に新たな乳房炎が発症していないデータのみを用いた。

#### 統計解析

菌種ごとのBF+株とBF-株の薬剤感受性率をフィッシャーの正確検定を用いて比較した。

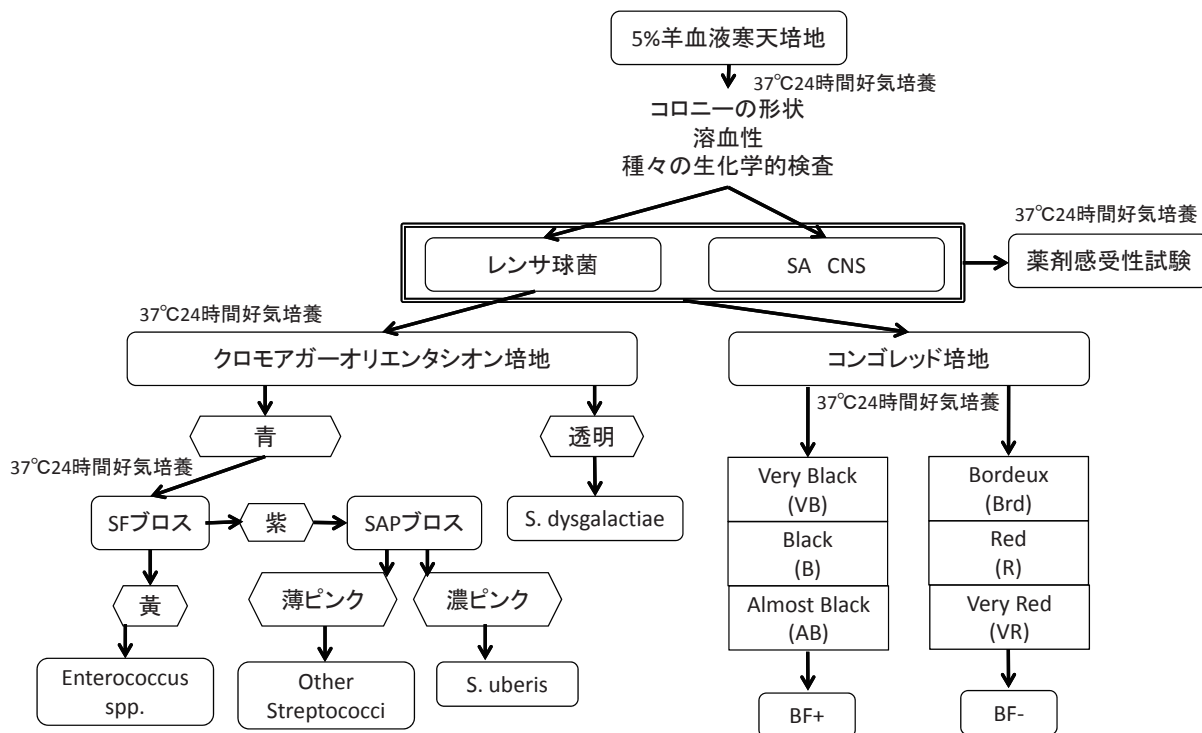


図1 細菌分離培養およびCRAによるBF形成能判定の流れ

菌種ごとのBF+株とBF-株の発症翌月のLSをマンホイット二検定を用いて比較し、いずれも有意水準5%で検定を行った。

**結果**

調査分房総数427分房中、調査対象菌種は382株検出され、その内わけは、SAが80株、CNSが90株、SUが68株、SDが45株、Entが11株、OSが88株であった。各菌種別BF形成能保有率を図2に示す。BF+株は、SAで11.8%、CNSで25.6%、SUで95.6%、SDで

77.8%、Entで90.9%、OSで60.2%であった。

BF形成能別薬剤感受性率においては、SAでのみペニシリンとエリスロマイシンの感受性率がBF+株で有意に小さくなっていたが、その他の菌種については有意な差は認められなかった(表2)。

BF形成能別の発症1ヶ月後の体細胞LSの比較では、SA、SU、SD、OSでBF+株はBF-株と比べLSが高くなる傾向を認めたものの、有意な差は認められなかった(図3)。

表2 菌種ごとのBF+株とBF-株の薬剤感受性率の比較

|                          | Biofilm | P      | K     | E      | T    | CZ   | CXM  |
|--------------------------|---------|--------|-------|--------|------|------|------|
| <i>S. aureus</i>         | +       | 77.8 * | 88.9  | 77.8 * | 88.9 | 77.8 | 88.9 |
|                          | -       | 98.5   | 100   | 100    | 95.6 | 97.1 | 100  |
| CNS                      | +       | 95.7   | 100.0 | 95.7   | 95.7 | 91.3 | 100  |
|                          | -       | 87.5   | 100.0 | 84.4   | 96.9 | 96.9 | 100  |
| <i>S. uberis</i>         | +       | 98.2   | 98.2  | 71.9   | 5.3  | 75.4 | 100  |
|                          | -       | 100    | 100   | 100    | 0    | 100  | 100  |
| <i>S. dysgalactiae</i>   | +       | 100    | 100   | 97.1   | 5.9  | 70.6 | 97.1 |
|                          | -       | 100    | 100   | 100    | 10   | 90   | 100  |
| <i>Enterococcus spp.</i> | +       | 100    | 90    | 60     | 10   | 40   | 70   |
|                          | -       | 100    | 100   | 100    | 0    | 100  | 100  |
| OS                       | +       | 100    | 97.9  | 97.9   | 4.2  | 91.7 | 95.8 |
|                          | -       | 96.9   | 90.6  | 90.6   | 0    | 93.8 | 100  |

\* 有意差あり(p<0.05) Fisherの正確検定

P: ペニシリン K: カナマイシン E: エリスロマイシン T: オキシテトラサイクリン CZ: セファゾリン CXM: セフロキシム

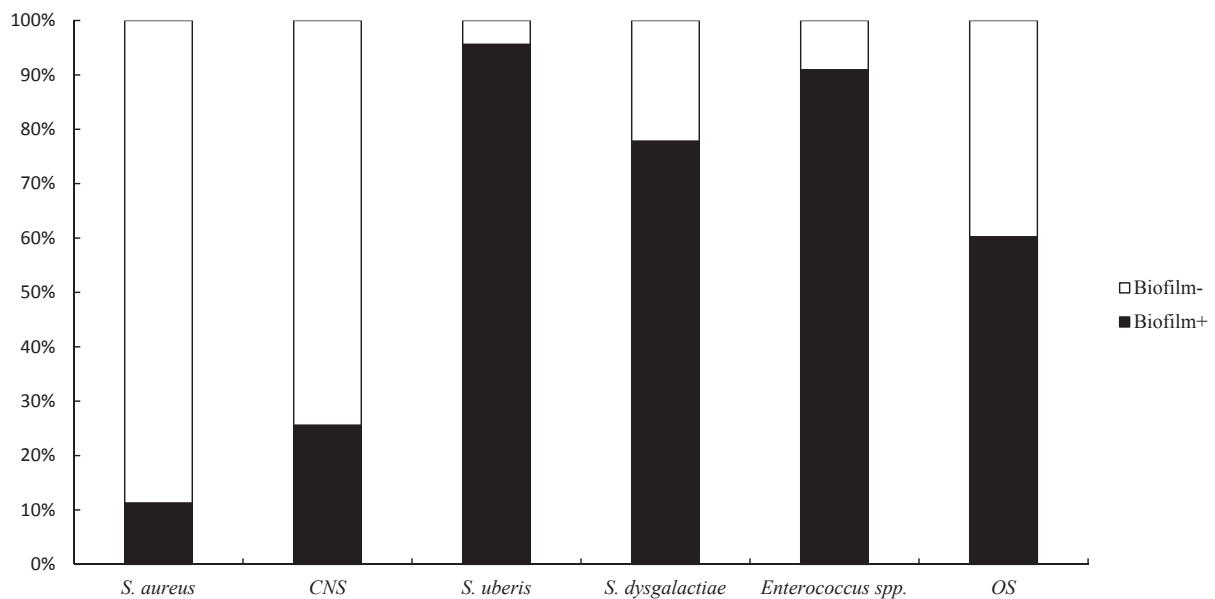


図2 菌種別BF形成能保有率

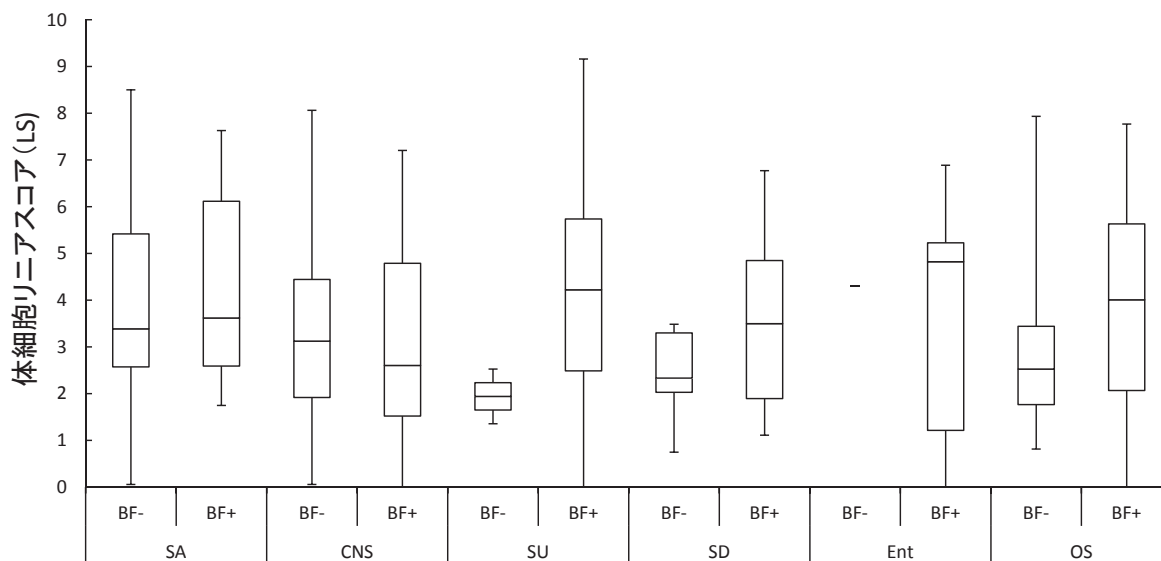


図3 BF+株とBF-株の発症後翌月の乳検データのLSの比較

### 【考察とまとめ】

#### 臨床型乳房炎由来菌によるBF形成の実態

当診療所管内で分離された臨床型乳房炎由来菌でブドウ球菌属に分類されるSAやCNSは、レンサ球菌属や腸球菌に分類されるSU、SD、Ent、OSと比べBF形成能保有率は低い傾向を認めた。本調査におけるSAのBF+株の出現率は、Dubravkaら[12]やBaselgaら[2]が報告している牛乳房炎由来SAのBF+株の出現率に近いものであった。しかし、Castelaniら[3]、Meloら[28]、Turkyilmazら[36]、Heら[18]、Vasudevanら[37]の結果と本調査の結果を比べると出現率は低かった。培養環境によってはEPS産生に関わる主要な遺伝子である*icaAD*の保有している牛すべてが、必ずしもCRAでslime形成をすることは限らず、遺伝子型の検査に加え表現型の検査も組み合わせの方がよいという報告もある[3, 28]。本調査では遺伝子型の検査を行っていないため、得られた結果はCRA法の検査感度に左右される可能性はあるが、Meloら[28]の報告では、*icaAD*遺伝子の保有をgold standardとした場合のCRA法の検査感度は88%、特異度は100%、Dhanawade[11]らの報告でも、同様のgold standardでCRAが最も感度の高い検査であったとしている。そのためCRA法は多少の偽陰性は含む可能性はあるが、臨床現場で

行えるBF形成能検査としては信頼性のある検査と考える。

一方、レンサ球菌属のBF+株の出現率は、Mooreの報告同様であった。特にSUやEntでのBF+株出現率は90%以上と非常に高く、いずれも難治性乳房炎の原因菌と言われる菌種であることを鑑みると、BF形成が治癒を妨げている可能性が示唆された。

#### BF形成と薬剤感受性の関係

BF内の細菌は様々な機構で抗生物質や免疫細胞の攻撃から身を守っていることが知られている[19, 23, 32, 39]。本調査で実際にBF+株とBF-株との間で感受性に違いがあるかディスク拡散法を用いて検証したところ、SAのBF+株でのみペニシリンとエリスロマイシンでBF-株に比べ有意に感受性率が低くなった。しかし、他の菌種ではBF+株がBF-株よりも感受性率が高いパターンも認められたため、SAのBF+株での感受率の低下が、純粋にBF形成によるものなのかは確認が得られなかった。さらに、複数の研究者がBF形成菌の薬剤感受性は、BFを形成した状況を再現していない従来の薬剤感受性試験で評価することは難しいという報告をしている[4, 31]。実際にOlsonら[31]はCalgary Biofilm Deviceを開発し、バイオフィルムを形成した細菌を根絶するために必要な最小薬剤濃度を表すMBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration)

の測定を行ったところ、多くの細菌でMBECがMICよりはるかに高い値を示していた。以上のことから、現在臨床現場で一般的に用いられているディスク拡散法による薬剤感受性試験を用いて、BF形成が疑われる感染症の薬剤感受性を評価することは困難である。これは、臨床現場でしばしば遭遇する、従来の薬剤感受性試験の結果と実際のin vivoでの薬剤の反応の不一致の原因の1つではないかと考える。

### BFによる薬剤耐性機構

BFは、①分子フィルターとして働き薬剤の浸透を妨げている、②BF内環境がBF内細菌の出す老廃物によって変化し、抗生物質の作用しにくい環境(pH、pCO<sub>2</sub>等の変化)になっている、③BF内の細菌の増殖速度が遅いことにより増殖期に作用しやすい薬剤への耐性を示すなど、様々な機構で薬剤に対する耐性を示していると考えられている[13]。特に③の機構については、persister cellというBF内の深層に存在し分裂が停止している状態の細菌が関与していると言われている[24, 25]。

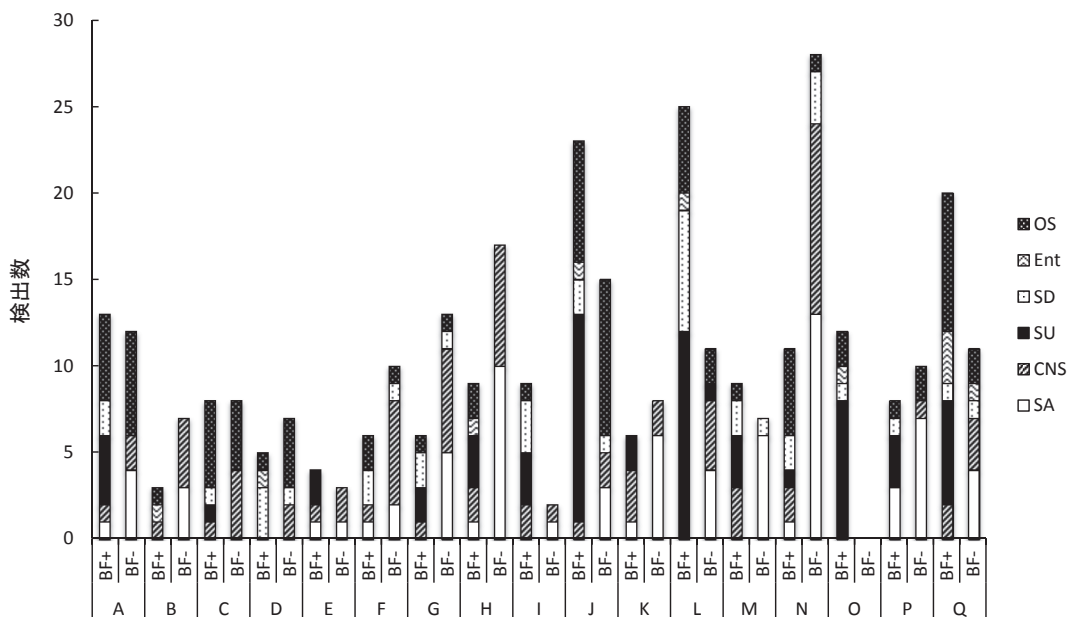
### Persister cellの存在

Persister cellとは名前の通り、BF内で抗生物質による攻撃を受けても“persist=存続する”細菌のことであり、その存在は1944年に

Biggerらによって発見された。Persisterは耐性菌とは異なり、遺伝的にはBF内で共生し分裂を続ける細菌と変わらない。しかし、その分裂速度は非常に遅く、BF内で共生する増殖が盛んな細菌と比べても、その数は最大でもBF内の総細菌数の1%程度しか達しないと言われている。しかし、抗生物質により増殖盛んな細菌が死滅すると、抗生物質の濃度が下がったところで、persisterが分裂を再開しBF内の細菌数をもとに戻そう働きはじめる。このような機構でBF形成菌が慢性感染症や難治性感染症に関わっていると言われている[25]。このような特徴からPersister cellはMRSAなどに代表されるような薬剤耐性遺伝子を獲得することによる薬剤耐性(drug resistance)ではなく、薬剤寛容(drug tolerance)であると表現される。

### 【BF形成菌の病原性】

今まで紹介してきたBFの特徴を鑑みると、BF形成菌が非形成菌に比べ急性期で臨床症状が強くでるとは考えにくく、むしろ慢性化、難治化に関わっていると考えられる。そこで本調査では、乳房炎発症翌月の体細胞LSを見ることで乳房炎の慢性化、あるいは難治化を見ることができないかと考えたが、BF+株とBF-株と



※左から調査機関中の平均バルク乳体細胞数が低い順に配列した

図4 農家別のBF+株とBF-株の検出数

の間で差は認められなかった (図 3)。今回の調査方法が適切であったかは疑問が残るが、現在乳房炎の慢性化を科学的に立証できる方法はあまりなく、今後有用な評価方法が開発されることを願う。当初 BF+ 株は、乳房炎の発生が多く再発を繰り返す農場で多く検出され、BF+ 株に感染した牛は、BF- 株に感染した牛に比べ乳質が悪いと予想していたが、予想に反し、乳質が良好な農場でも BF+ 株は検出されていた (図 4, 5)。この結果は畜主の乳房炎に発見する感度の違い、治療方法の違い、治癒判定基準の違いによるものと考えられる。感受性のある抗生物質を適正な量で、適正な期間投与していないと、前述したように persister cell が残った状態で抗生物質の濃度が低くなり、分裂の再開を招くことになると考えられる。

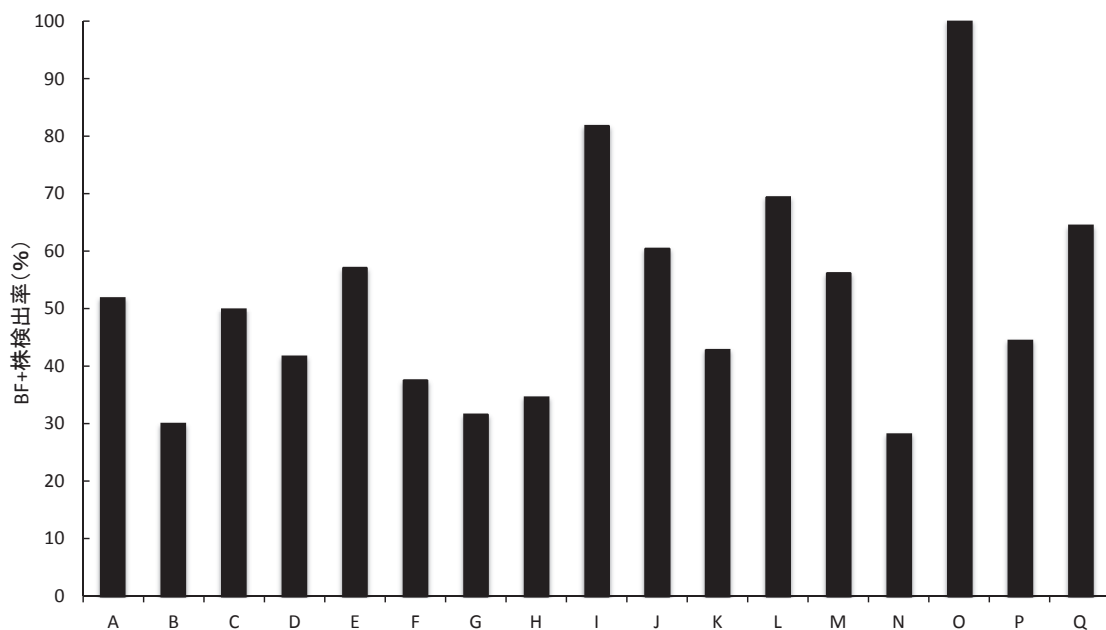
#### 【臨床現場における対 BF 関連感染症戦略】

本調査では、明確に BF+ 株の病原性について示すことはできなかったが、医療の分野からの報告からもわかるように、BF が感染症の慢性化、難治化に関与している可能性は非常に高い。医療の分野ではマクロライド系抗生物質が BF 関連遺伝子の発現を抑えるとの報告がさ

れている [34, 41]。また 14 印環マクロライドの長期投与が慢性肺炎の治療に有効である可能性について触れた報告もある [42, 43]。しかし、これらの報告は限定された菌種においてのみ検証されていることに加え、sub-MIC でのマクロライドの投与やその他様々な抗生物質を sub-MIC で投与した場合、逆に BF 形成を促進させたという報告もされていることから、産業動物の臨床現場での応用は慎重にならなければならないと考える [21, 40]。現在 BF に関しては未解明なことが多く、今後国内における産業動物の分野でも積極的な研究が必要である。BF が形成されてしまった状態での有効かつ現実的な治療法はまだ確立されていないため、研究が進む間、臨床現場においては BF を形成させない治療法を確立させる必要があると考える。

#### 【引用文献】

1. Aricola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E. and Montanaro, L. 2002. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate test based on colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus.



※左から調査機関中の平均バルク乳体細胞数が低い順に配列した

図 5 農家ごとの BF+ 株検出率

- Biomaterials 23(21):4233-3239.
- Baselga, R., Albizu, I., Cruz, M., Cacho, E. D., Barberan, M. and Amorena, B. 1993. Phase Variation of Slime Production in *Staphylococcus aureus*: Implications in Colonization and Virulence. *Infect. Immun.* 61(11):4857-4862.
  - Castelani, L., Pilon, L. E., Martins, T., Pozzi, C. R. and Arcaro, J. R. P. 2015. Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. *Anim. Sci. J.* 86.3:340-344.
  - Ceri, H., Olson, M. E., Stremik, C., Read, R. R., Morck, D. and Buret, A. 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilm. *J. Clin. Microbiol.* 37(6):1771-1776.
  - Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. and Beachey, E. H. 1982. Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infect. Immun.* 37(1):318-326.
  - Christensen, G. D., Simpson, A. W., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H. 1985. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J. Clin. Microbiol.* 22(6):996-1006.
  - Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. 1999. Bacterial Biofilms: A Common cause of Persistent Infections. *Science* 284:1318-1322.
  - Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J. R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 183(9):2888-2896.
  - Cucarella, C., Tormo, M. A., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, I., Foster, T. J. and Penades, J. R. 2002. Expression of the Biofilm-Associated Protein Interferes with Host Protein Receptors of *Staphylococcus aureus* and Alters the Infective Process. *Infect. Immun.* 70(6):3180-3186.
  - Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J. R. 2004. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72(4):2172-2185.
  - Dhanawade, D. E., Kalorey, D. R., Srinivasan, K. R., Barbudde, S. B. and Kurkure, N. V. 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 34(1):81-89.
  - Dubravka, M., Lazic, S., Branka, V., Jelena, V., Bugarski, D. and Zorica, S. 2010. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Vet. (Beograd).* 60:217-226.
  - Dunne, W. M. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews.* 15(2):155-166.
  - Ebrahimi, A., Moatamedi, A., Lotfalian, S. and Mirshokrael, P. 2013. Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran. *Vet. Res. For.* 4(4):269-272.
  - Fox, L. K., Zadoks, R. N. and Gaskins, C.T. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107:295-299.
  - Freeman, D. J., Falkiner, F. R. and Keane, C. T. 1982. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42:872-874.
  - Gotz, F. 2002. Staphylococcus and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43(6):1367-1378.
  - He, J., Wang, A., Liu, G., Gao, J., Ali, T. and Han, B. 2014. Biofilm Formation and Biofilm-Associated Genes Assay of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in China. *Pak. Vet. J.* 34(4):508-513.
  - Jesaitis, A. J., Franklin, M. J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C. I., Bleazard, J. B., Duffy, J. E., Beyenal, H. and Lewandowski, Z. 2003. Comprised Host Defense on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Characterization of Neutrophil and Biofilm Interactions. *J. Immunol.* 171:4329-4339
  - Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schunck, R. P., Nunes, A. P. F. 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diag. Microbio. Infect. Dis.* 75:235-239.
  - Kaplan, J. 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 34(9):737-751.
  - 草場信之, 坂本道生, 小野崎正修, 鈴木貴博, 三木渉. 2014. 牛臨床型乳房炎由来レンサ球菌に対する簡易鑑別法の検討. *家畜診療* 10:627-632.
  - Leid, J. G., Shiirtliff, M. E., Costerton, J. W. and Stoodley, P. 2002. Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Infect. Immun.* 70(11):6339-6345.
  - Lewis, K. 2001. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(4):999-



- 1007.
25. Lewis, K. 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*. 5:48-56.
  26. McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L. and O'Neill, E., O'Gara. 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect. Microbiol*. 5:1-9.
  27. Melchoir, M. B., Osch, M. H. J., Lam, T. J. G. M., Vernooij, J. C. M., G. and Fink-Gremmels, J. 2011. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J. Dairy Sci.* 94:5926-5936.
  28. Melo, P. C., Ferreira, L. M., Filho, A. N., Zafalon, L. F., Vicente, I. G. and Souza, V. 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz. J. Microbiol.* 44(1):119-124.
  29. Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A. and O'Toole, G. A. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. A short review. *Pulm, Pharmacol, Ther.* 21(4):595-599.
  30. Moore, G. E. 2009. Biofilm Production by *Streptococcus uberis* Associated with Intramammary Infections. (Thesis).
  31. Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G. and Read, R. R. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66:86-92.
  32. Pozo, J. L. and Patel, R. 2007. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. *Translational Medicine* 82(2):204-209.
  33. Raza, A., Muhammad, G., Sharif, S. and Atta, A. 2013. Biofilm Producing *Staphylococcus aureus* and Bovine Mastitis: A Review. *Mol. Microbiol. Res.* 3:1-8.
  34. Sato, K., Inuma, Y., Hasegawa, T., Horii, T., Yamashino, T. and Ohta, M. 2000. Effect of Subinhibitory Concentrations of Macrolides on Expression of Flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(10):2869-2872.
  35. Snel, G. G. M., Monecke, S., Ehricht, R. and Piccinini, R. 2015. Molecular characteristics of bap-positive *Staphylococcus aureus* strains from dairy cow mastitis. *J. Dairy Res.* 82(3):312-316.
  36. Turkyilmaz, S. and Eskiizmirli, S. 2006. Detection of Slime Factor Production and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* Strains Isolated from Various Animal Clinical Samples. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30:201-206
  37. Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K. S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. 92:179-185.
  38. Veh, K. A., Klein, R. C., Ster, C., Keefe, G., Lacasse, P., Scholl, D., Roy, J. P., Haine, D., Dufor, S., Talbot, B. G., Ribon, A. O. B. and Malouni, F. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and non-persistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J. Dairy Sci.* 98:155-168.
  39. Vuong, C., Voyich, J. M., Fisher, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R. and Otto, M. 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular Microbiology* 6(3):269-275.
  40. Wang, Q., Sun, F. J., Liu, Y., Xiong, L. R., Xie, L. L. and Xia, P. Y. 2010. Enhancement of Biofilm Formation by Subinhibitory Concentrations of Macrolides in icaADBC-Positive and Negative Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(6):2707-2711.
  41. Wang, S., Yang, Y., Zhao, Y., Bai, J., Chen, J., Zhou, Y., Wang, C. and Li, Y. 2016. Sub-MIC Tylosin Inhibits *Streptococcus suis* Biofilm Formation and Results in Differential Protein Expression. *Frontiers in Microbiology* 7:1-9.
  42. Wozniak, D. J. and Keyser, R. 2004. Effects of Subinhibitory Concentrations of Macrolide Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *CHEST journal*. 125(2)suppl:62S-69S.
  43. Yanagihara, K., Tomono, K., Imamura, Y., Kaneko, Y., Kuroki, M., Sawai, T., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mukae, H., Kadota, J. and Kohno, S. 2002. Effect of clarithromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49:867-870.
  44. Zhou, H., Chao, X., Fei, M., Dai, Y. and Liu, B. 2013. Analysis of *S. epidermidis icaA* and *icaD* genes by polymerase chain reaction and slime production: a case control study. *BMC Infectious Disease*. 13(1):1-7.
  45. Zuniga, E., Melville, P. A., Saidenberg, A. B. S., Laes, M. A., Gonsales, F. F., Salaberry, S.

R. S., Gregori, F., Brandao, P. E., Santos, F. G. B., Lincopan, N. E. and Benites, N. R. 2015. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microbial Pathogenesis* 89:1-6.

## Detection of biofilm formation, antibiotic susceptibility and virulence in pathogens isolated from bovine clinical mastitis

Yusuke Yamashita, Keigo Kosenda, Noriko Sakazume, Toshitsugu Yamanaka,  
Koutarou Makino, Satomi Nakata, Toshiyuki Shimohira, Michie Tan,  
Reona Kobayashi, Takashi Yoshida, Hiroshi Tsunoda

Kamikawa-kita Agriculture and Mutual Aid Association  
(3343-2 Higashiyama, Shibetsu-city, Hokkaido, 095-0044)

### **[Abstract]**

Biofilm formation and its relationship to recalcitrant and chronic infections are reported in several studies. However, there are not many reports regarding biofilm formation of pathogens isolated from bovine clinical mastitis (CM) in Japan. Within this context, the objective of the present study was to investigate biofilm formation of *Staphylococci* (*Staphylococcus aureus* : SA, *Coagulase Negative Staphylococci* : CNS) , *Streptococci* (*Streptococcus uberis* : SU, *Streptococcus dysgalactiae* : SD, *Other streptococci* : OS) and *Enterococci* (Ent) isolated from 382 samples from CM on Congo Red Agar (CRA), the difference in antibiotic susceptibility and virulence between biofilm producers (BF+) and non-producers (BF-) of each pathogens. Disk diffusion method and the SCC linear score (LS) data from one month after the onset of mastitis was used to compare antibiotic susceptibility and virulence between BF+ and BF- of each pathogen. 9/80 (11.3%) of SA, 23/90 (25.6%) of CNS, 65/68 (95.6%) of SU, 35/45 (77.8%) of SD, 53/88 (60.2%) of OS and 10/11 (90.9%) of Ent were BF+. There was no significant difference in antibiotic susceptibility between BF+ and BF- in most of the pathogens, but proportion of susceptible SA BF+ strains were significantly low in penicillin and erythromycin compared to BF- ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference in LS data from one month after the onset of mastitis between BF+ and BF- of each pathogen. These results show that some of the pathogens from CM in Japan are BF+ and its antibiotic susceptibility and virulence are not so different from BF-. However, the latter half needs more thorough investigation. Because for antibiotic susceptibility, there are some studies indicating that standard susceptibility test cannot properly evaluate the susceptibility of BF+ pathogens in vivo. Also for virulence, scientific evaluation standard for chronic mastitis hasn't been developed, so the possibility of our evaluation being inadequate is undeniable.

**Keywords:** biofilm, Congo Red Agar, bovine clinical mastitis, chronic infections, antibiotic susceptibility