

Formação de biofilme por *Moraxella* spp. isoladas em surtos de Ceratoconjuntivite Infecçiosa Bovina no Brasil

Cinthia de Carvalho Coutinho⁽¹⁾⁽²⁾, Clarissa Vidal de Carvalho⁽¹⁾⁽²⁾, Raíssa Cury Ferreira⁽²⁾⁽³⁾, Robert Domingues⁽³⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁴⁾, Alessandra Barbosa Ferreira Machado⁽⁵⁾, Yasmin Neves Vieira Sabino⁽⁶⁾, Emanuelle Baldo Gaspar⁽⁷⁾, Joao Claudio do Carmo Panetto⁽⁷⁾ e Marta Fonseca Martins⁽⁷⁾

⁽¹⁾Estudante de graduação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estudante de graduação, Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Professora Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾Bolsista CNPq., Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁷⁾Pesquisadores, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Resumo — A Ceratoconjuntivite Infecçiosa Bovina (CIB) é uma doença ocular comumente observada em bovinos ao redor do mundo. A CIB, apesar de ter baixa mortalidade, representa uma preocupação significativa para produtores de leite devido ao impacto econômico decorrente da redução do bem-estar animal e da produtividade. Além disso, há uma escassez de dados epidemiológicos acerca dessa doença no Brasil. Bactérias do gênero *Moraxella*, especialmente *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi*, são frequentemente associadas à CIB, sendo *M. bovis* a única espécie com patogenicidade confirmada. Recentemente, *Moraxella oculi* e *Moraxella* sp. foram descritas em casos clínicos da doença, mas a contribuição específica dessas bactérias no desenvolvimento da CIB ainda não foi definida, exigindo investigações adicionais. O tratamento para ceratoconjuntivite é baseado na remediação sintomática, sendo um processo onerosa e dificultada pela formação de biofilmes bacterianos, que favorecem a cronicidade das infecções. Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme de linhagens de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, *Moraxella oculi* e *Moraxella* sp. isoladas de casos de CIB utilizando o protocolo adaptado de cristal violeta. Os resultados indicaram que *M. bovoculi*, *M. oculi* e *Moraxella* spp. apresentam forte capacidade de formação de biofilme, enquanto *M. bovis* mostrou capacidade fraca. Esses achados ressaltam a necessidade do desenvolvimento estratégias terapêuticas mais eficazes que levem em consideração a resistência bacteriana promovida por biofilmes.

Termos para indexação: *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, *Moraxella oculi*, CIB, protocolo de cristal violeta.

Density versus volume of liquid diet: effect on body development and performance of calves

Abstract — Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (IBK) is an ocular disease commonly observed in cattle worldwide. Although IBK has low mortality, it is a significant concern for dairy producers due to the economic impact resulting from decreased animal welfare and productivity. Additionally, there is a scarcity of epidemiological data regarding this disease in Brazil. Bacteria of the genus *Moraxella*, particularly *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi*, are frequently associated with IBK, with *M. bovis* being the only species with confirmed pathogenicity. Recently, *Moraxella oculi* and *Moraxella* sp. have been described in clinical cases of the disease, but the specific contribution of these bacteria to the development of IBK has not yet been defined, necessitating further investigation. Treatment for keratoconjunctivitis is based on symptomatic remediation, which is a costly process complicated by bacterial biofilm formation, which promotes infection chronicity. Thus, this study aimed to evaluate the biofilm formation capability of strains of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, *Moraxella oculi*, and *Moraxella* sp. isolated from IBK cases using the adapted crystal violet protocol. The results indicated that *M. bovoculi*, *M. oculi*, and *Moraxella* spp. exhibited strong biofilm

formation capability, while *M. bovis* showed weak capacity. These findings highlight the need for the development of more effective therapeutic strategies that account for bacterial resistance promoted by biofilms.

Index terms: *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, *Moraxella oculi*, IBK, crystal violet assay.

Introdução

A Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB) é uma doença ocular de alta morbidade e rápida disseminação frequentemente observada em bovinos ao redor do mundo. Embora seja utilizada como um termo “guarda-chuva” para diversas doenças oculares bovinas, Kneipp (2021) propõe a caracterização da CIB a partir de quadro clínico com a presença de aumento da lacrimação, epífora, conjuntivite serosa ou mucopurulenta e ceratite. Bactérias do gênero *Moraxella*, como *M. bovis* e *M. bovoculi*, são comumente isoladas em casos de CIB, embora somente a espécie *M. bovis* tenha sua patogenicidade confirmada (Loy et al., 2021). *Moraxella oculi* (Wilkes et al., 2024) e *Moraxella* spp. foram recentemente isoladas em animais apresentando sinais clínicos da doença, porém a relação dessas bactérias com o desenvolvimento da CIB é ainda indefinida. Dessa forma, a caracterização dessas espécies e sua relação com a doença demandam investigações adicionais para esclarecer a contribuição potencial de *Moraxella* spp. ao quadro clínico observado.

Embora a CIB apresente baixa mortalidade, a doença ainda causa grande preocupação entre os produtores de leite devido ao impacto econômico ocasionado e pelos danos ao bem-estar animal. A ausência de dados epidemiológicos e de um diagnóstico específico para a condição dificultam a aferição direta dos prejuízos financeiros associadas aos surtos de CIB. O impacto ao bem-estar animal, contudo, é apontado como fator indireto de perda econômica, uma vez que os animais acometidos pela CIB apresentam dificuldade para ganhar peso e têm a sua produtividade reduzida (Dennis; Kneipp, 2021).

O tratamento da doença também é apontado como uma das principais fontes de gastos relacionada à CIB. Como as causas e a fisiopatologia da doença ainda não estão totalmente esclarecidas, as estratégias de tratamento geralmente focam na remediação dos sintomas ou no combate a um potencial patógeno inespecífico. Linhagens patogênicas geralmente apresentam forte capacidade de adesão celular como um de seus fatores de virulência, sendo essa uma característica crucial para a formação e estabilidade de biofilmes (Ely et al., 2019). O biofilme bacteriano não apenas facilita a persistência das células no ambiente e nos hospedeiros, mas também está associada à cronicidade das infecções e dificuldades terapêuticas. Portanto, analisar a capacidade de formação de biofilme por isolados bacterianos advindos de casos de CIB é fundamental para compreender a patogênese da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas. Assim, este estudo teve como objetivo determinar a capacidade de produção de biofilme por diferentes espécies de *Moraxella* isoladas de casos de CIB a partir do protocolo modificado de coloração com cristal violeta.

O conteúdo desse documento vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 1 – “Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares”; ODS 8 – “Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico

sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos”; ODS 12 - “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”.

Material e métodos

As culturas de *Moraxella* utilizadas neste estudo foram previamente isoladas de olhos e narinas de bovinos com sinais clínicos iniciais de CIB em rebanhos de cidades do Rio Grande do Sul (Alegrete, Uruguaiana e Dom Pedrito) e de Minas Gerais (Coronel Pacheco). Os isolados foram previamente identificados por sequenciamento do tipo Sanger da região espaçadora intergênica do rRNA 16S-23S como *Moraxella bovis* P49 e 7220OD, *Moraxella bovoculi* 150OE e 2135OD1, *Moraxella oculi* 2117OE2 e 2153OD2 e *Moraxella* sp 7664RN e 7624LN.

O protocolo do cristal violeta proposto por Stepanovic (2007) foi adaptado e utilizado para a avaliação quantitativa da formação de biofilme. As bactérias foram cultivadas em Ágar-Sangue por pelo menos 24 h a 35 °C com posterior transferência de 5 colônias a 10 colônias para microtubos contendo 3 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Kaski) ou *Tryptic Soy Broth* (TSB, Acumedia). Os pré-inóculos foram então incubados a 35 °C sem e com agitação a 200 rpm por 48 h para comparação das melhores condições de crescimento. Após este período os tubos foram vortexados por 30 seg para homogeneização da cultura e a absorbância das amostras foi medida a 600 nm em espectrofotômetro EON (BioTek). A DO 600 nm inicial foi então ajustada para 0,05. Para preparação do inóculo, aproximadamente 200 µL de cada amostra foram transferidos para uma microplaca de 96 poços com posterior incubação a 35 °C por 24 h. Após o período de crescimento, os poços foram lavados 3 vezes com 300 µL de tampão fosfato-salino (PBS 1x, pH 7,2) para eliminação das células não aderidas e secados à temperatura ambiente por 30 min em capela de fluxo. As amostras foram fixadas com 200 µL de metanol 99% por 15 min e coradas com o mesmo volume de solução de cristal violeta 2% por 5 min. O excesso de corante foi lavado em água corrente e o restante ressuspenso em 200 µL de solução de ácido acético 33%. A formação do biofilme foi mensurada por meio da leitura da DO a 570 nm das amostras. A interpretação dos resultados obtidos foi feita de acordo com Stepanovic (2007), onde a formação do biofilme é classificação em ausente, fraca, moderada ou forte. O experimento foi realizado em triplicata técnica e duplicata biológica.

Resultados e discussão

O valor da DO do branco utilizado como referência para a classificação das linhagens foi de 0,07. Portanto, bactérias com $DO < 0,07$ não foram consideradas produtoras de biofilme; aquelas com $0,07 < DO < 0,14$ foram classificadas como fraca produtoras, enquanto as com DO entre 0,14 e 0,28 foram categorizadas como produtoras moderadas de biofilme. Culturas com $DO > 0,28$ foram consideradas como forte produtoras de biofilme. *Moraxella bovoculi*, *Moraxella oculi*, e *Moraxella* spp., demonstraram forte capacidade de formação de biofilme em todas as condições de crescimento, enquanto ambos os isolados de *M. bovis* apresentaram fraca capacidade de produção de biofilme quando crescidas em TSB e ausente em BHI, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação da produção de biofilme de acordo com o valor médio da DO 570 nm final obtido por cada linhagem dos isolados do gênero *Moraxella* em diferentes meios com (+) e sem (-) agitação.

Espécie	Isolado	Origem	Coleta	BHI -	BHI +	TSB -	TSB +
<i>Moraxella bovis</i>	P49	Alegrete, RS	2018	Ausente (0,039)	Ausente (0,043)	Fraca (0,1)	Forte (0,316)
<i>Moraxella bovis</i>	7220OD	Dom Pedrito, RS	2018	Ausente (0,042)	Ausente (0,048)	Fraca (0,104)	Fraca (0,129)
<i>Moraxella bovoculi</i>	150OE	Uruguaiana, RS	2018	Forte (1,887)	Forte (0,992)	Forte (0,707)	Forte (1,053)
<i>Moraxella bovoculi</i>	2135OD1	Coronel Pacheco, MG	2022	Forte (1,960)	Forte (1,908)	Forte (1,005)	Forte (0,902)
<i>Moraxella oculi</i>	2117OE2	Coronel Pacheco, MG	2022	Forte (0,478)	Forte (0,432)	Forte (0,296)	Forte (0,477)
<i>Moraxella oculi</i>	2153OD2	Coronel Pacheco, MG	2022	Forte (0,462)	Forte (0,650)	Forte (0,364)	Forte (0,353)
<i>Moraxella</i> sp.	7664RN	Dom Pedrito, RS	2018	Forte (0,575)	Forte (0,406)	Forte (0,482)	Forte (0,406)
<i>Moraxella</i> sp.	7624LN	Dom Pedrito, RS	2018	Forte (0,435)	Moderada (0,226)	Forte (1,014)	Forte (0,621)

A baixa adesão e produção de biofilme por *M. bovis* não está de acordo com o registrado na literatura disponível. Ely (2018) relatou grande produção de biofilme pela espécie ao realizarem o mesmo teste com o cultivo de isolados da espécie em TSB estático. O baixo resultado obtido para *M. bovis* pode ter sido ocasionado pelo fato de P49 e 7220OD se tratarem de linhagens não formadoras de biofilme, vide ser comum a observação de variabilidade do nível de produção dentro de uma mesma espécie (Branda, 2005).

Durante o preparo do teste, também foram observadas diferenças na consistência do material aderido ao fundo dos poços. *M. bovoculi* e *Moraxella* spp. mostraram adesão homogênea, enquanto *M. bovis* e *M. oculi* formaram grumos no fundo dos recipientes. Também foi possível observar de forma inconstante entre as culturas a formação de uma película microbiana na superfície do meio líquido de cultura. Branda (2005) classifica a formação película como um tipo de biofilme sobrenadante. Por não estar aderido diretamente à placa de titulação, o biofilme flutuante produzido pelas linhagens de *Moraxella* é perdido durante o procedimento de lavagem dos poços resultando em um resultado falso negativo.

Os dados obtidos permitiram confirmar a capacidade de produção de biofilme por espécies de *Moraxella* associadas à CIB. No entanto, por mais que o protocolo original reconhecesse a possibilidade de formação de biofilme flutuante, sua perda era inevitável durante o processo de lavagem dos poços. Dessa forma, é necessário realizar experimentos futuros que desenvolvam e implementem metodologias mais apropriadas para quantificar de forma eficiente o biofilme flutuante produzido por essas culturas.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo destacam a variabilidade e elevada capacidade de formação de biofilme entre diferentes espécies de *Moraxella* associadas à CIB. *M. bovoculi*, *M. oculi* e *Moraxella* spp. demonstraram forte capacidade de produção de biofilmes, enquanto os isolados de *M. bovis* exibiram capacidade moderada. Estas descobertas sublinham a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor os fatores

que influenciam a virulência e a cronicidade das infecções causadas por essas bactérias, possibilitando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e direcionadas.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil pela bolsa PIBIC e financiamento do projeto (403830/2023-0). À Fapemig pelo apoio financeiro (APQ-00957-23).

Referências

- BRANDA, S. S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>.
- DENNIS, E. J.; KNEIPP, M. A review of global prevalence and economic impacts of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 355-369, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.03.010>.
- ELY, V. L.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; OLIVEIRA, H. P.; PÖTTER, L.; REGHELIN, M. A.; FERNANDES, A. W.; PEREIRA, D. I. B.; SANGIONI, L. A.; BOTTON, S. A. Moraxella bovis, Moraxella ovis and Moraxella bovoculi: biofilm formation and lysozyme activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 2, p. 369-376, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14086>.
- KNEIPP, M. Defining and diagnosing infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 237-252, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.03.001>.
- LOY, J. D.; CLOTHIER, K. A.; MAIER, G. Component causes of infectious bovine keratoconjunctivitis: non-moraxella organisms in the epidemiology of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 37, n. 2, p.295-308, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.03.005>.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 115, n., 8, p. 891-899, 2007. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- WILKES, P. R.; ANIS, E.; KATTOOR, J. J. Moraxella oculi sp. nov., isolated from a cow with infectious bovine keratoconjunctivitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 74, n. 2, 006281, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006281>.