

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**Perfil de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *Moraxella
bovoculi* e *Moraxella ovis* aos antimicrobianos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Grazieli Maboni

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Perfil de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* aos antimicrobianos

Grazieli Maboni

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof^a Dr^a Agueda Palmira Castagna de Vargas

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a dissertação de mestrado

**Perfil de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e
Moraxella ovis aos antimicrobianos**

Elaborada por
Grazieli Maboni

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Agueda Palmira Castagna de Vargas, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Fabricio Rochedo Conceição, Dr. (UFPEl)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 06 de setembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À equipe do LABAC que de forma direta ou indireta colaboraram com a realização deste trabalho, em especial Marcelo Schwab, Caiane Tasca e Valessa Ely.

Um agradecimento especial à doutoranda Leticia Gressler Trevisan pela dedicação incansável a este estudo e à bolsista de iniciação científica Julia Espindola pela prontidão em ajudar.

À professora Agueda, pela oportunidade de fazer o mestrado, pelos ensinamentos e pela preocupação para com todos.

Ao Felipe, pela disponibilidade e inesgotável fonte de estímulo.

À todos que de alguma forma me ajudaram neste período de mestrado, muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

Perfil de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* aos antimicrobianos

AUTORA: GRAZIELI MABONI

ORIENTADORA: AGUEDA PALMIRA CASTAGNA DE VARGAS

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 06 de setembro de 2013

A ceratoconjuntivite infecciosa (CI), também conhecida como “pinkeye”, é uma doença ocular que acomete bovinos e ovinos. Em bovinos os micro-organismos envolvidos na CI são *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi*. Já em ovinos são *Mycoplasma conjunctivae*, *Clamidia psittaci* e *M. ovis*. A terapia antimicrobiana é amplamente utilizada para essa enfermidade, desta forma é imprescindível a realização de testes de suscetibilidade com a finalidade de escolher de forma prudente o fármaco a ser utilizado. Contudo, estudos sobre a suscetibilidade de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* são escassos na literatura científica, sendo que no Brasil não existem trabalhos que descrevem o perfil de suscetibilidade de *M. bovoculi* e *M. ovis*. Testes de suscetibilidade para *Moraxella* spp. são determinados na rotina laboratorial pelo método de disco difusão, e, de forma geral, emprega-se o método de microdiluição em caldo com fins epidemiológicos, como caracterizar isolados de um surto ou de uma região específica. Neste contexto, esta dissertação objetivou determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*, isoladas no Brasil, por meio dos métodos de microdiluição em caldo e disco difusão em ágar frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de CI e desta forma verificar diferenças nos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos das três espécies de *Moraxella* testadas. Também buscou-se avaliar a concordância entre o método de disco difusão em ágar e microdiluição em caldo. Amostras de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*, oriundos de casos clínicos de CI, foram identificados por meio de análise morfo-tintorial e testes bioquímicos e a identificação das espécies foi realizada por análise molecular. Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), obtidas no método de microdiluição em caldo e o diâmetro do halo de inibição obtido no método de disco difusão em ágar, foram utilizados os seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefoperazona, ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina, florfenicol, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina e penicilina. As cepas de *Moraxella* spp. foram sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados. As CIM e CBM foram, de forma geral, superiores para as cepas de *M. bovis* quando comparadas com *M. bovoculi* e *M. ovis*. Para a maioria dos fármacos avaliados observou-se boa concordância entre o método teste e o método de referência, exceto para a oxitetraciclina e a penicilina. Ao analisar a concordância dos métodos em cada espécie de *Moraxella* verificou-se que as menores porcentagens, assim como as maiores quantidades de erros, foram encontradas para as cepas de *M. bovis*. Os resultados deste trabalho demonstram que *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* apresentam diferenças quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Palavras chave: Enfermidade de bovinos e ovinos. Doença ocular. *Moraxella* spp. Antimicrobianos. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

Antimicrobial susceptibility profile of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*

AUTHOR: GRAZIELI MABONI

ADVISER: AGUEDA PALMIRA CASTAGNA DE VARGAS

Santa Maria, September 6, 2013.

Infectious keratoconjunctivitis (IK), also known as “pinkeye”, is an ocular disease that affects cattle and sheep. In cattle, the microorganisms involved are *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. In sheep, the main microorganisms isolated from lesions are *Mycoplasma conjunctivae*, *Chlamydia psittaci* and *M. ovis*. Antibiotics are widely used in the treatment of this disease; therefore, to perform tests of susceptibility is essential in order to use the most effective drugs. However, few studies about the susceptibility of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* to antibiotics are available in the literature. In Brazil, there are no studies describing the susceptibility profile of *M. bovoculi* and *M. ovis*. Susceptibility tests for *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* are routinely determined at laboratories by disk diffusion method. On the other hand, the broth microdilution method, which is the reference method, is used for *Moraxella* spp. with epidemiological purposes, such as, to define the antimicrobial susceptibility profiles of strains from a specific region. This dissertation aimed to determine the antimicrobial susceptibility of Brazilian strains of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* by broth microdilution and disk diffusion for the main antimicrobials used to treat IK and, thus, to verify differences in antimicrobial susceptibility profiles of the three species of *Moraxella*. We also aimed to evaluate the agreement between the disk diffusion and broth microdilution method. In order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), obtained by the broth microdilution method, and the diameter of inhibition zone, obtained by disk diffusion method, the following antimicrobials were used: ampicillin, cefoperazone, ceftiofur, cloxacillin, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, neomycin, oxytetracycline and penicillin. The MIC and MBC were higher for *M. bovis* than for *M. bovoculi* and *M. ovis*. The drugs evaluated showed good agreement between disc diffusion and the reference method, except oxytetracycline and penicillin. When analyzed the methods agreement for each *Moraxella* species we found lower rates of agreement, as well as, more quantities of errors in *M. bovis* strains. The results of this study emphasize that *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* have a different antimicrobial susceptibility profile.

Key words: Bovine and ovine disease. Eye disease. *Moraxella* spp. Antimicrobials. Bacterial resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios das lesões da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. A) Área central de opacidade da córnea. B) Área central de opacidade da córnea circundada por um halo vermelho de hiperemia. Há espessamento e neovascularização da córnea e hiperemia da conjuntiva bulbar. C) Conificação da córnea (ceratocone). D) Ulceração da córnea com ceratomálacia e hemorragia.....17

ARTIGO 1

Figura 1 - Representação gráfica da CIM e do diâmetro do halo de inibição da cloxacilina para *M. bovis*.....42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Número de cepas de *Moraxella* spp. com as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM, CIM₅₀, CIM₉₀, CBM₅₀ e CBM₉₀), moda/CIM e resistência frente aos antimicrobianos testados.....39
- Tabela 2 - Média dos halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão para 32 cepas de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*..... 40
- Tabela 3 - Concordância e erros dos resultados do método de disco difusão e o método de referência (microdiluição em caldo) para as cepas de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*.....41

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE A - Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos de <i>Moraxella bovis</i> , <i>Moraxella bovoculi</i> e <i>Moraxella ovis</i> obtidos por disco difusão em ágar e microdiluição em caldo.....	50
APÊNDICE B – Identificação e origem das cepas de <i>Moraxella bovis</i> , <i>Moraxella bovoculi</i> e <i>Moraxella ovis</i> conforme registros do Laboratório de Bacteriologia da UFSM.....	51
APÊNDICE C – Concentração inibitória mínima (CIM- µg/ml) e concentração bactericida mínima (CBM- µg/ml) de <i>Moraxella bovis</i> frente a dez agentes antimicrobianos.....	52
APÊNDICE D – Concentração inibitória mínima (CIM- µg/ml) e concentração bactericida mínima (CBM- µg/ml) de <i>Moraxella bovoculi</i> frente a dez agentes antimicrobianos.....	53
APÊNDICE E – Concentração inibitória mínima (CIM- µg/ml) e concentração bactericida mínima (CBM- µg/ml) de <i>Moraxella ovis</i> frente a dez agentes antimicrobianos.....	54
APÊNDICE F – Diâmetro do halo de inibição das cepas de <i>Moraxella bovis</i> , <i>Moraxella bovoculi</i> e <i>Moraxella ovis</i> frente aos dez antimicrobianos testados.....	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Etiologia.....	13
2.2 Epidemiologia.....	14
2.3 Patogenia e sinais clínicos	15
2.4 Controle e profilaxia	17
2.5 Suscetibilidade aos antimicrobianos	18
3 ARTIGO 1	20
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
5 REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A.....	50

1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite infecciosa (CI), também conhecida como “*pinkeye*”, é uma das doenças oculares de maior importância para a criação de bovinos e ovinos no mundo, sendo caracterizada por alta morbidade, pois pode afetar até 80% do rebanho (POSTMA et al., 2008). Os animais acometidos apresentam manifestações clínicas que iniciam com lacrimejamento, fotofobia, edema e opacidade de córnea podendo evoluir para úlcera de córnea e cegueira irreversível (BAPTISTA, 1979). A CI provoca perdas econômicas significantes, como diminuição do ganho de peso e da produção de leite e elevados custos com tratamento (SLATTER et al., 1982). No Brasil, essa enfermidade tem sido diagnosticada na maioria dos estados, estando amplamente disseminada na região sul do Rio Grande do Sul (GIL TURNES, 2001).

Em bovinos, os micro-organismos envolvidos na CI são *Moraxella bovis* (HENSON; GRUMBLES, 1960), *Moraxella ovis* (ELAD et al., 1988) e *Moraxella bovoculi* (ANGELOS et al., 2007). Já em ovinos, nos quais a CI também é chamada de oftalmia contagiosa, os principais micro-organismos isolados de lesões clínicas são *Mycoplasma conjunctivae*, *Chlamydia psittaci* e *M. ovis*.

A conduta terapêutica e profilática inclui o uso de antimicrobianos e vacinas, respectivamente. No entanto, a profilaxia é, em geral, prejudicada por situações de ineficácia de vacinas comercialmente disponíveis (O’CONNOR et al., 2011). Desta forma, antimicrobianos são amplamente utilizados, o que pode favorecer a seleção de cepas de *Moraxella* spp. resistentes aos principais fármacos usados no tratamento dessa enfermidade. Neste sentido, é fundamental conhecer o perfil antimicrobiano das cepas circulantes em determinada região, para que, se a enfermidade ocorrer, o tratamento realizado seja o mais adequado possível.

Neste estudo, serão abordadas informações referentes aos micro-organismos *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*, enfatizando-se os aspectos relacionados à patogenia, sinais clínicos, tratamento, controle e profilaxia da ceratoconjuntivite infecciosa bovina e ovina. Por fim, serão apresentados os resultados do estudo experimental dos perfis de suscetibilidade das três espécies de *Moraxella* frente a dez antimicrobianos por meio das técnicas de microdiluição em caldo e disco difusão em ágar, nas quais serão verificadas as concentrações inibitórias mínimas e os diâmetros dos halos de inibição, respectivamente. Devido ao amplo uso do método de disco

difusão em ágar para a determinação da suscetibilidade de *Moraxella* spp. na rotina laboratorial, também será avaliada a concordância dos perfis de suscetibilidade obtidos com o método de disco difusão e o método de microdiluição em caldo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

Moraxella spp. é o gênero bacteriano mais comumente isolado de lesões clínicas de CI. É uma bactéria gram negativa, imóvel, aeróbica, oxidase positiva, variável para catalase e colagenase e que não é capaz de esporular (BROWN et al., 1998). O pleomorfismo é característico de bactérias desse gênero, que se apresentam em pares ou em cadeias curtas, variando de cocos, diplococos, cocobacilos e bacilos (PUGH; HUGHES, 1966). Em meio ágar sangue formam colônias lisas ou rugosas, com 1 a 3 milímetros de diâmetro, circulares e esbranquiçadas (BROWN et al., 1998).

Em bovinos, os micro-organismos envolvidos na CI são *Moraxella bovis* (HENSON; GRUMBLES, 1960), *Moraxella ovis* (ELAD et al., 1988) e *Moraxella bovoculi*. Essa última foi recentemente identificada como uma nova espécie de *Moraxella* presente em casos clínicos da enfermidade em bovinos e está filogeneticamente relacionada à *M. bovis* e *M. ovis* (ANGELOS et al., 2007). *M. bovoculi* foi distinguida dos membros do gênero *Moraxella* pela sua caracterização bioquímica, sustentada pela análise do gene constitutivo 16S (ANGELOS; BALL 2007). *M. bovis* é considerado o agente etiológico primário de CI bovina (WEBER et al., 1982), apesar de outros micro-organismos já terem sido isolados (NAGLIC et al., 1996) e cultura microbiológica mista (com mais de uma espécie de *Moraxella*) poder ser encontrada (LIBARDONI et al., 2012). Culturas puras de *M. bovoculi* também podem ser isoladas (ANGELOS et al., 2007), porém, a patogenicidade dessa espécie de *Moraxella* em CI bovina ainda é controversa (GOULD et al., 2013). *M. ovis* também pode ser isolada de lesões clínicas de CI em bovinos, porém, com uma menor frequência (O'CONNOR et al., 2012). Embora haja fortes indícios da participação de *M. bovoculi* e *M. ovis* na patogenia da CI em bovinos, como o isolamento dessas bactérias de animais com CI e a presença de fatores de virulência semelhantes aos encontrados em *M. bovis*, ainda não foi possível comprovar a participação de *M. bovoculi* e *M. ovis* na etiologia da ceratoconjuntivite bovina (GOULD et al., 2013). Desta forma, *M. bovis* é o único agente etiológico reconhecido para essa doença (ANGELOS, 2010). Em ovinos, a etiologia primária é atribuída ao *Mycoplasma conjunctivae* e *Clamydia psittaci*, sendo que *M. ovis* desempenha o papel secundário de exacerbar os sinais clínicos em infecções

concomitantes com os dois primeiros agentes (DAGNALL, 1994). Com uma menor frequência, *M. bovis* também pode ser isolada de lesões de CI em ovinos (LIBARDONI et al., 2012).

2.2 Epidemiologia

A CI é uma doença altamente contagiosa e sua ocorrência é influenciada por fatores relacionados ao hospedeiro e ao ambiente, como por exemplo, a idade, a raça e condição imunológica dos animais acometidos, condições climáticas, exposição à luz ultravioleta, presença de moscas que atuam como vetores mecânicos e a virulência das cepas de *Moraxella* spp. (BAPTISTA, 1979).

A doença afeta animais de todas as idades, contudo, animais jovens são geralmente mais suscetíveis à doença (SLATTER et al., 1982). Após a manifestação clínica, o animal permanece portador de *Moraxella* spp. e desta forma pode ser um reservatório da enfermidade em um rebanho. Em relação às raças de bovinos, Hereford e Aberdeen Angus são mais predispostas que zebuínos ou suas cruzas (WEBBER; SELBY, 1981). A maior prevalência de CI em Hereford está associada a fatores como a falta de pigmentação da pálpebra e a ineficiente ação bactericida da solução lacrimal (SNOWDER et al., 2005).

Surtos desta enfermidade ocorrem com maior frequência no verão e outono, entretanto, há relatos de surtos ocorridos no inverno (HUGHES; PUGH, 1970; ÅKERSTEDT; HOFSHAGEN, 2004). Essa diferença sazonal está associada à exposição prolongada do animal à radiação ultravioleta (HUGHES; PUGH, 1970) e ao aumento da população de vetores mecânicos, como moscas (GEEM; BROCE, 1985). Após a exposição à radiação ultravioleta ocorre maior degeneração das células epiteliais da córnea, outros defeitos epiteliais e aumento da renovação celular, facilitando a colonização de *Moraxella* spp. na córnea (VOGELWEID et al., 1986). Várias espécies de moscas que carregam *M. bovis* em suas patas podem transmitir o micro-organismo a animais suscetíveis (STEVE; LILLY, 1965).

Outros fatores predisponentes como irritação nos olhos causada por poeira, vento, pastagens e outros elementos que causam injúrias mecânicas aumentam a suscetibilidade à CI, assim como, fatores estressantes como o transporte prolongado dos animais (PUGH; MCDONALD, 1986).

CI tem sido relatada em ruminantes de todo o mundo e também na maioria dos estados brasileiros. Os rebanhos das regiões sul e de fronteira do Rio Grande do Sul são os mais atingidos pela doença (BAPTISTA; RIBEIRO, 1974).

2.3 Patogenia e sinais clínicos

M. bovis possui diversos fatores de virulência, mas dois são determinantes para a ocorrência da doença clínica: a presença de fímbrias e citotoxina (hemolisina) (POSTMA et al., 2008). Fímbrias constituem os fatores primários de patogenicidade, já que são responsáveis pela aderência às células epiteliais do hospedeiro (POSTMA et al., 2008). Tem sido demonstrado que cepas de *M. bovis*, cujas fímbrias foram desnaturadas por tratamento químico (MgCl₂ a 10%), perderam sua patogenicidade para bovinos, a auto-aglutinabilidade e a propriedade de aglutinar hemácias (GIL TURNES, 1983). Algumas colônias fimbriadas, ao serem removidas do ágar, deixam pequenas concavidades no meio de cultivo, fenômeno conhecido por corrosão do ágar. Além disso, essas colônias também apresentam uma forma de translocação superficial conhecida como “*twitching motility*”. Ágar corrosão e “*twitching motility*” são características comuns a bactérias que expressam fímbrias tipo 4 (MATTICK et al., 1996). Fímbrias tipo 4 são encontradas em *M. bovis* e são filamentos localizados nos pólos da bactéria (RUFFOLO et al., 1997). Fímbrias tipo 4 estão, freqüentemente, mas não obrigatoriamente, ligadas à competência para aquisição de DNA (transformação) e absorção de bacteriófagos (KEIZER et al., 2001). Existe variação antigênica entre as fímbrias de *M. bovis*, sendo de fundamental importância utilizar cepas vacinais que possuam variantes antigênicos. Um sistema de caracterização unificado foi relatado para identificar diferenças nos antígenos fimbriais. Esse sistema foi baseado nas propriedades antigênicas das fímbrias, identificando sete sorogrupos (denominados de A a G) entre isolados recuperados no Reino Unido, Austrália, Nova Zelândia e Estados Unidos (MOORE; LEPPER, 1991). Com cepas de *M. bovis* oriundas do Brasil, Argentina, Uruguai e Estados Unidos foi identificada a presença de seis sorogrupos de antígenos somáticos de *M. bovis* através de um teste de imunodifusão (GIL TURNES; ARAÚJO, 1982). Esses trabalhos demonstram que existem diferenças antigênicas entre as cepas prevalentes em diferentes regiões.

A citotoxina de *M. bovis* (MbxA) é uma toxina RTX (*repeats in the structural toxin*) que se localiza dentro de um operon RTX de uma ilha de patogenicidade de *M. bovis*

(ANGELOS et al., 2001). Cepas não hemolíticas são frequentemente isoladas de bovinos e, geralmente, não estão associadas com doença clínica (BROWN et al., 1998). Estudos indicam que cepas hemolíticas de *M. bovis* produzem a citotoxina produtora de poros na membrana citoplasmática das células alvo (epiteliais, leucócitos, hemácias), provocando efluxo de potássio e desequilíbrio osmótico, o que leva à necrose e perda do epitélio da córnea (úlceras de córnea) (ANGELOS et al., 2001). Outros fatores de virulência incluem fosfolipases, sistema de aquisição de ferro e lipopolissacarídeo somático (LPS ou endotoxina). Diferentes cepas de *M. bovis*, bem como diferentes isolados da mesma cepa podem variar quanto a sua virulência (POSTMA et al., 2008).

A função de *M. bovoculi* na patogenia de CI não está definida, pois nenhum estudo publicado até o momento associou a lesão de córnea a uma possível infecção causada por *M. bovoculi* (GOULD et al., 2013). Entretanto, existem evidências de que vacinas autógenas contendo antígenos de *M. bovoculi* são capazes de prevenir CI em rebanhos bovinos (ANGELOS, 2010). Um operon RTX completo (denominado para *M. bovoculi* de mbvCABD) foi identificado, além de haver um alto grau de similaridade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos existente entre os genes do operon RTX de ambas, *M. bovoculi* e *M. bovis* (ANGELOS; BALL, 2007). Essas observações sugerem uma possível participação de *M. bovoculi* na patogenia da CI bovina.

Em ovinos, a inoculação experimental de *M. ovis* não reproduz lesões consistentes com CI (SPRADBROW, 1971), entretanto, outros estudos demonstram que *M. ovis* aumenta a severidade das lesões causadas por *Mycoplasma conjunctivae* (DAGNALL, 1994). Até o momento não está descrito na literatura científica a presença de fatores de virulência, como fímbrias, para *M. ovis*. No entanto, assim como definido para *M. bovoculi*, as cepas de *M. ovis* possuem um operon RTX completo, chamado de movCABD (ANGELOS; BALL, 2007).

Em resumo, a sucessão de eventos que leva à manifestação de CI inicia-se quando cepas patogênicas de *Moraxella* spp. sintetizam fímbrias de aderência. As fímbrias reconhecem receptores específicos presentes na conjuntiva e na córnea, fixando-se às células (GIL TURNES, 2001). Exotoxinas com atividade enzimática e inclusive lipopolissacarídeo somático provocariam lesões na superfície da córnea permitindo a invasão das bactérias, que, através das exotoxinas produzem uma desorganização das fibras de colágeno (ARAÚJO; RICCIARDI, 1988). A lesão celular desencadeia um processo inflamatório que provoca edema de córnea e migração de células inflamatórias (GIL TURNES, 2001). Durante essa sucessão de eventos o animal apresenta lacrimejamento, blefaroespasmos e fotofobia. Após, a ceratite pode evoluir para conjuntivite, sendo que a secreção ocular que primariamente é aquosa passa a ser

purulenta. Dentro de poucos dias o animal apresenta opacidade de córnea que pode evoluir para úlcera de córnea (Figura 1).



Figura 1 – Estágios das lesões da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. A) Área central de opacidade da córnea. B) Área central de opacidade da córnea circundada por um halo vermelho de hiperemia. Há espessamento e neovascularização da córnea e hiperemia da conjuntiva bulbar. C) Conificação da córnea (ceratocone). D) Ulceração da córnea com ceratomálacia e hemorragia. FONTE: Claudio Lombardo de Barros, Laboratório de Patologia Veterinária – UFSM.

2.4 Controle e profilaxia

Dentre as formas de controle e profilaxia de CI a terapia antimicrobiana e a vacinação são as medidas utilizadas com maior frequência. Uma vez que *M. bovis* é considerada a causa primária de CI, todas as vacinas comerciais disponíveis possuem apenas antígenos deste micro-organismo. Esse pode ser um dos motivos pelo qual a efetividade dessas vacinas no controle de CI é questionável (O'CONNOR et al., 2011). Duas possíveis razões para as falhas vacinais incluem a variação antigênica entre as cepas de *M. bovis* e a presença de outros micro-organismos envolvidos na enfermidade (BROWN et al., 1998). No Brasil, não existem vacinas comerciais disponíveis para CI ovina. Estudos com vacinas autógenas contendo antígenos de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*, realizados em rebanhos bovinos nos Estados Unidos, sugerem que essas vacinas são geralmente ineficazes no controle de ceratoconjuntivite (FUNK et al.,

2009; O'CONNOR et al., 2011). Da mesma forma, estudos com vacinas recombinantes contendo apenas antígenos de *M. bovoculi* concluem que esse tipo de vacina não é eficaz no controle de ceratoconjuntivite bovina associada à *M. bovoculi* e *M. bovis* (ANGELOS et al., 2010).

Embora a terapia antimicrobiana seja amplamente utilizada para CI, essa medida não garante a erradicação do estado de animal portador da enfermidade (BROWN et al., 1998). O tratamento dos casos clínicos deve começar imediatamente após o diagnóstico da doença, como forma de impedir que lesões irreparáveis de córnea se estabeleçam. O antimicrobiano escolhido deve ser administrado via parenteral ou aplicado nas glândulas lacrimais, ou de forma tópica no saco conjuntival (GIL TURNES, 2001). Existe um grande número de fármacos utilizados no tratamento de CI, contudo, a oxitetraciclina, a penicilina e o florfenicol são antimicrobianos mais amplamente utilizados e são relatados como eficazes no tratamento desta enfermidade (ALLEN et al., 1995; EASTMAN et al., 1998; ANGELOS et al., 2000; GOKCE et al., 2002).

2.5 Suscetibilidade aos antimicrobianos

De forma geral, *Moraxella* spp. é sensível a maioria dos antimicrobianos. Contudo, podem existir diferenças nos padrões de suscetibilidade entre cepas isoladas em locais distintos, de um mesmo rebanho, ao longo de um surto ou de um mesmo animal (GIL TURNES; ALBUQUERQUE, 1984). Nas últimas décadas, tanto na literatura veterinária nacional como internacional, os dados de perfis de suscetibilidade de *Moraxella* spp. são anteriores a identificação da *M. bovoculi* e portanto, restringiram-se a estudos com *M. bovis* (WEBBER et al., 1982; SHRYOCK et al., 1998; ZIELINSKI et al., 2000; CONCEIÇÃO et al., 2004; McCONNEL et al., 2007).

No Brasil, a suscetibilidade de *M. bovis* foi determinada por Conceição et al. (2004) que avaliou o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *M. bovis* oriundas da Argentina, Brasil e Uruguai, através das técnicas de Kirby-Bauer e microdiluição em ágar. Nesse estudo, as amostras foram sensíveis a ampicilina, cefalosporina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, nitrofurantoína, rifampicina e tetraciclina, sendo que, a resistência foi relatada à eritromicina, lincomicina e novobiocina. No entanto, na literatura científica não existem estudos que apresentam o perfil de suscetibilidade de cepas brasileiras de *M. bovoculi* e *M. ovis*.

Nos Estados Unidos, Weber et al. (1982) relata que cepas de *M. bovis* foram sensíveis a maioria dos antimicrobianos, no entanto, altos índices de resistência à cloxacilina e à estreptomicina foram encontrados entre cepas hemolíticas de *M. bovis*. Em outro estudo, realizado nesse mesmo país, as baixas concentrações inibitórias mínimas de eritromicina, ceftiofur, ampicilina, tilmicosina e gentamicina, para *M. bovis*, sugerem que esses fármacos podem possuir uma boa eficácia clínica. Em estudos na Argentina e na Austrália, as cepas de *M. bovis* apresentaram, de forma uniforme, suscetibilidade aos antimicrobianos testados (ZIELINSKI et al., 2000; McCONNEL et al., 2007).

A suscetibilidade de *M. bovoculi* aos antimicrobianos foi avaliada apenas com cepas oriundas dos Estados Unidos (ANGELOS et al., 2011). Os resultados sugerem que o perfil de suscetibilidade encontrado para as cepas de *M. bovoculi* não difere dos já relatados na literatura científica para *M. bovis*. Desta forma, os autores supõem que os antimicrobianos utilizados para tratar CI em bovinos causada por *M. bovis* também são eficazes contra *M. bovoculi*.

Para *M. ovis*, apenas um estudo realizado na Bélgica descreve o perfil de suscetibilidade desta espécie (CATRY et al., 2007). Esses autores relatam que cepas de *M. ovis* oriundas do trato respiratório de bovinos apresentaram resistência apenas à eritromicina, sendo que para a ampicilina, ceftiofur, oxitetraciclina, gentamicina, trimetoprim-sulfonamida, eritromicina, tilmicosina, florfenicol e enrofloxacin os valores das concentrações inibitórias mínimas foram consideravelmente baixos (CATRY et al., 2007).

Os estudos sobre a suscetibilidade de *Moraxella* spp. aos antimicrobianos são necessários para conhecer e monitorar o perfil das cepas atuantes em um surto ou região e para a construção de estratégias de tratamento efetivas, principalmente quando a recuperação dos animais não procede de acordo com o esperado. Tanto na CI bovina quanto na ovina, a terapia antimicrobiana é imprescindível e deve ser adotada levando-se em consideração a necessidade de combater duas ou mais espécies de *Moraxella* spp. presentes na mesma lesão.

3 ARTIGO 1

**Diferenças no perfil de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *M. bovoculi*
e *M. ovis* aos antimicrobianos**

Grazieli Maboni, Agueda Castagna de Vargas

**Diferenças no perfil de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*
aos antimicrobianos**

**Differences in the antimicrobial susceptibility profile of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and
*M. ovis***

Grazieli Maboni ¹, Agueda Castagna de Vargas ^{1*}

RESUMO

A ceratoconjuntivite infecciosa (CI), também conhecida como “*pinkeye*”, é uma doença ocular que acomete bovinos e ovinos. Em bovinos os micro-organismos envolvidos na CI são *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi*. Já em ovinos são *Mycoplasma conjunctivae*, *Clamidia psittaci* e *M. ovis*. A terapia antimicrobiana é amplamente utilizada para essa enfermidade, desta forma é imprescindível a realização de testes de suscetibilidade com a finalidade de escolher de forma prudente o fármaco a ser utilizado. O objetivo deste estudo foi determinar diferenças no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* aos antimicrobianos, bem como a concordância entre o método de disco difusão em ágar e o método de referência. Cepas de *Moraxella* spp. oriundas de casos clínicos de ceratoconjuntivite infecciosa de bovinos e ovinos foram avaliadas pelos métodos de microdiluição em caldo e disco difusão frente a ampicilina, cefoperazona, ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina, florfenicol, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina e penicilina. Os resultados mostraram que as cepas de *Moraxella* spp. foram sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados mas foram evidenciadas diferenças quanto ao perfil de

¹Laboratório de Bacteriologia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, prédio 44, sala 5137, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: aguada.vargas@gmail.com

suscetibilidade aos antimicrobianos entre *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*. As cepas de *M. bovis* analisadas neste estudo diferem das demais espécies de *Moraxella* spp. por apresentarem maiores concentrações de CIM e CBM, menores porcentagens de concordância e maiores quantidades de erros entre os métodos analisados. A partir dos resultados obtidos no teste *in vitro*, é possível apontar a ampicilina, ceftiofur, florfenicol, enrofloxacin e gentamicina como os fármacos para os quais as três espécies de *Moraxella* apresentaram o melhor perfil de sensibilidade. Os métodos de microdiluição em caldo e disco difusão são concordantes para a determinação da suscetibilidade das cepas de *Moraxella* spp. para maioria dos antimicrobianos, exceto para a penicilina e oxitetraciclina, uma vez que, pode ocorrer situações de falsa sensibilidade no método de disco difusão.

Palavras-chave: suscetibilidade antimicrobiana, doença ocular, ceratoconjuntivite.

ABSTRACT

Infectious keratoconjunctivitis (IK) affects cattle and sheep and is characterized by the development of conjunctivitis and corneal ulcers. In cattle, the microorganisms involved in IK are *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi*. In contrast, in sheep, the main microorganisms isolated from IK lesions are *Mycoplasma conjunctivae*, *Chlamydia psittaci* and *Moraxella ovis*. Antibiotics are widely used in the treatment of this disease; therefore, to perform tests of susceptibility is essential in order to use the most effective drugs. The aim of this study was to determine differences in the antimicrobial susceptibility profile of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*, as well as, to evaluate the agreement between the disk diffusion and the reference method (broth microdilution). Strains of *Moraxella* spp. isolated from bovine and ovine with infectious keratoconjunctivitis were tested by broth microdilution test and disk diffusion for ampicillin, cefoperazone, ceftiofur, cloxacillin, enrofloxacin, florfenicol,

gentamicin, neomycin, oxytetracycline and penicillin. The results demonstrated that *Moraxella* spp. strains were sensitive for the antimicrobials tested, but there are differences in antimicrobial susceptibility profile between *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. The *M. bovis* strains analyzed in this study differ from other *Moraxella* species due to the higher concentrations of MIC and MBC, smaller percentages of agreement and higher quantities of errors between the methods analyzed. The in vitro results demonstrate that the three *Moraxella* species showed the best susceptibility profile for ampicillin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol and gentamicin. Broth microdilution and disc diffusion are concordant for determining the susceptibility of *Moraxella* spp. for the antimicrobials tested, except for penicillin and oxytetracycline, because the disk diffusion method showed false sensitivity results.

Key words: Antimicrobial susceptibility, eye disease, keratoconjunctivitis.

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite infecciosa (CI) acomete bovinos e ovinos e caracteriza-se pelo desenvolvimento de conjuntivite e úlcera de córnea (BAPTISTA, 1979). Em bovinos, os micro-organismos envolvidos na CI são *Moraxella bovis* (HENSON & GRUMBLES, 1960), *Moraxella ovis* (ELAD et al., 1988) e *Moraxella bovoculi* (ANGELOS et al., 2007). Por outro lado, nos ovinos, os principais micro-organismos isolados de lesões de CI são *Mycoplasma conjunctivae*, *Chlamydia psittaci* e *Moraxella ovis*. Em ovinos, *M bovis* também pode ser isolada, porém com uma menor frequência (LIBARDONI et al., 2012). O tratamento desta enfermidade é baseado em terapia antimicrobiana, a qual deve ser adotada levando-se em consideração a necessidade de combater duas ou mais espécies de *Moraxella* presentes na mesma lesão. Entretanto, estudos sobre a suscetibilidade aos antimicrobianos de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* são escassos na literatura científica, sendo este o primeiro estudo no Brasil, que relata o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *M. bovoculi* e *M. ovis*.

A suscetibilidade aos antimicrobianos pode ser avaliada por dois testes comumente utilizados, o método de disco difusão em ágar e o método de microdiluição em caldo, ambos regulamentados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). O primeiro é muito utilizado na prática veterinária devido a sua praticidade, porém, os resultados obtidos são apenas qualitativos. Já o segundo teste, é o método de referência definido pelo CLSI e fornece a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos antimicrobianos, sendo estes, dados quantitativos (NIELSEN et al., 2007). Testes de suscetibilidade para *Moraxella* spp. são determinados na rotina laboratorial pelo método de disco difusão, e, de forma geral, emprega-se o método de microdiluição em caldo para caracterizar isolados de um surto ou uma região específica, com fins epidemiológicos. Na literatura científica tem sido relatado, a partir de resultados obtidos no teste de microdiluição em caldo e de disco difusão, que *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* são suscetíveis a maioria dos antimicrobianos (WEBBER et al., 1982; SHRYOCK et al., 1998; ZIELINSKI et al., 2000; CATRY et al., 2007; McCONNEL et al., 2007; ANGELOS et al., 2011). No entanto, até o momento, não existem trabalhos que descrevem, concomitantemente, diferenças no perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* quando utilizadas técnicas qualitativas (disco difusão) ou quantitativas (microdiluição em caldo).

Diante da necessidade de medidas adequadas de profilaxia e devido à existência de infecções mistas na CI, é necessário conhecer o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Moraxella* spp. circulantes em determinada região, para que, se a enfermidade ocorrer, o tratamento realizado seja o mais adequado possível. Além disso, é importante estabelecer o desempenho do método de disco difusão, amplamente utilizado na rotina laboratorial, em relação ao método de referência. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar diferenças no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *M. bovis*, *M. bovoculi*

e *M. ovis*, bem como avaliar a concordância entre o método de disco difusão e microdiluição em caldo.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação das amostras

Amostras oriundas de casos clínicos de CI em bovinos e ovinos ocorridos no sul do Brasil foram previamente processadas e 32 amostras foram caracterizados como *Moraxella* spp. por meio de análise morfo-tintorial e testes bioquímicos (MACFADDIN, 2000). Para determinação da espécie foi realizada identificação molecular; o DNA foi extraído por meio do método de termo-extração segundo SAMBROOK & RUSSELL (2001). Na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados os iniciadores ISRup (5' ACCGACGCTTATCGCAGGTCACTA-3') e ISRdown (5'-GTGTCGAAGCAAAATCAGGGTCGT-3'), conforme ANGELOS & BALL (2007) os fragmentos de 650pb correspondem à *M. bovis* e 600pb à *M. bovoculi* ou *M. ovis*. Para a distinção das espécies de *Moraxella* foi utilizada a enzima *RsaI* (Jena Bioscience®) que cliva somente o DNA amplificado de *M. bovoculi* (600pb) em um único sítio de restrição, o que resulta em dois fragmentos de aproximadamente 150 e 450pb. A enzima *RsaI* não cliva o fragmento de *M. bovis* (650pb) nem de *M. ovis* (600pb) (ANGELOS & BALL, 2007). Das 32 cepas de *Moraxella* spp., dez foram identificadas como *M. bovis* e 11 como *M. bovoculi*, oriundas de bovinos, e 11 cepas como *M. ovis* isoladas de ovinos.

Método de disco difusão

O perfil de suscetibilidade das cepas de *Moraxella* spp. foi determinado pelo método de disco difusão (BAUER, 1966). Colônias suspensas em solução de NaCl 0,85%, na turbidez de 0,5 na escala de MacFarland ($\approx 10^8$ unidades formadoras de colônia – UFC) foram semeadas em ágar Mueller Hinton (Himedia Laboratories®) adicionado de sangue ovino a 5%. Após, discos

de ampicilina (10µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), penicilina (10U), ceftiofur (30µg), cloxacilina (1µg), enrofloxacina (5µg), florfenicol (30µg) (Laborclin®) cefoperazona (75µg) e oxitetraciclina (30µg) (Oxoid®) foram depositados sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas à 35 °C durante 24 horas. Cepas de referência da *American Type Culture Collection* de *M. bovis* ATCC 10900, *M. bovoculi* ATCC BAA1259 e *M. ovis* ATCC 19575 foram utilizadas como controles. Uma cepa de referência de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle de qualidade.

Método de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas frente aos mesmos antimicrobianos analisados no teste descrito anteriormente. A CIM foi realizada em microplacas de 96 poços por meio do método de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo CLSI (2013). Volumes de 100 microlitros (µL) de inóculo bacteriano 10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foram adicionados a 100µL de caldo Miller-Hinton (Difco®) cátion ajustado com 20 microgramas/litro (µg/L) de cálcio e 10 µg/L de magnésio. Neste volume, cada antimicrobiano estava diluído em 12 diferentes concentrações (32 µg/mL à 0,015 µg/mL), diluído na razão dois. Todos as cepas foram analisados em triplicata juntamente com as cepas de referência (*M. bovis* ATCC 10900, *M. bovoculi* ATCC BAA1259, *M. ovis* ATCC 19575 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Por fim, as microplacas foram incubadas em aerobiose à 35°C durante 24 horas.

Para determinar a CBM, volumes de 10µL das concentrações dos fármacos, iguais e maiores do que as CIMs, foram semeados em placas de ágar Muller-Hinton (Himedia Laboratories®) e estas foram incubadas à 35°C durante 24 horas.

Interpretação dos resultados

Os resultados foram interpretados segundo as normas do CLSI (2013). Na interpretação dos resultados do método de microdiluição em caldo, os pontos de corte “*breakpoints*” para determinação dos perfis sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) foram definidos conforme os critérios padronizados para patógenos gram-negativos associados à doença respiratória bovina, pois para *Moraxella* spp. não existe pontos de corte estabelecidos pelo CLSI. Não foi estabelecida a sensibilidade ou resistência para a cefoperazona, cloxacilina e neomicina, uma vez que para esses fármacos valores padronizados não estão disponíveis (CLSI, 2013). O valor da CIM foi definido como a menor concentração de antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um micro-organismo. O valor de CIM₅₀ e CIM₉₀ foi definido como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de 50% e 90% das cepas, respectivamente. A CBM₅₀ e CBM₉₀ foram definidas como a menor concentração de antimicrobiano capaz de causar a morte do inóculo bacteriano para 50% e 90% das cepas, respectivamente.

Na interpretação dos resultados do método de disco difusão foram utilizados os critérios padronizados para patógenos gram-negativos associados à doença respiratória bovina (CLSI, 2013). No entanto, para a gentamicina os critérios utilizados foram conforme o padrão de interpretação de diâmetro derivado de isolados clínicos humanos e para a ampicilina e oxitetraciclina conforme os critérios padronizados para enterobactérias (CLSI, 2013). Para a penicilina foram utilizados critérios definidos para *Neisseria gonorrhoeae* (ANDREWS, 2011).

Foram comparados os valores obtidos no teste de microdiluição em caldo com os valores do disco difusão a fim de obter a porcentagem de concordância e a frequência de erros muito graves (cepa resistente na metodologia de referência é avaliada como sensível pela metodologia testada; falsa sensibilidade), erros graves (cepa sensível na metodologia de referência é avaliada como resistente pela metodologia testada; falsa resistência) e erros leves (cepa sensível ou

resistente na metodologia de referência é avaliada como intermediária pelo disco difusão, ou cepa intermediária é avaliada como sensível ou resistente) para cada antimicrobiano testado (AMBAYE, et al 1997).

Análise estatística

Os valores de CIM, CBM e do diâmetro do halo de inibição para as espécies de *Moraxella* frente aos antimicrobianos testados foram avaliados pelo teste de *Kruskal-Wallis* e submetidos ao cálculo de medidas de posição. Quando identificadas diferenças entre espécies de *Moraxella* aplicou-se o teste de *Bonferroni* para comparar as médias. Os valores dos halos de inibição para cada antimicrobiano que apresentaram normalidade foram submetidos à análise de regressão, na qual, a escolha dos modelos baseou-se na significância dos coeficientes linear, quadrático e cúbico, utilizando-se o teste “t”, de Student, em 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS, versão 9.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de microdiluição em caldo e disco difusão (faixa de variação e média dos halos de inibição) para as 32 cepas de *Moraxella* spp. frente aos dez antimicrobianos testados estão apresentados na tabela 1 e 2, respectivamente. De forma geral, a relação dos valores de CIM e CBM foi similar, ou seja, a mesma concentração de antimicrobiano é capaz de inibir o crescimento bacteriano e também de matar o micro-organismo (Tabela 1).

No método de microdiluição em caldo, 40% (4/10) e 20% (2/10) das cepas de *M. bovis* apresentaram resistência à penicilina e oxitetraciclina, respectivamente (Tabela 1). Já pelo método de disco difusão as mesmas cepas apresentaram 10% (1/10) de resistência e 30% (3/10) de sensibilidade intermediária à penicilina. CONCEIÇÃO et al. (2004) relatam resistência de *M. bovis*, oriundas de casos clínicos de CI na América do Sul, apenas para a eritromicina, dentre seis antimicrobianos testados pelo método de microdiluição em caldo. Por outro lado, cepas de

M. bovis isoladas nos Estados Unidos da América foram resistentes para a gentamicina e oxitetraciclina (SHRYOCK et al., 1998).

Dentre as cepas de *M. bovoculi* analisadas observou-se resistência apenas para a penicilina (9% - 1/11) no método de microdiluição em caldo, o que corrobora com os resultados relatados por ANGELOS et al. (2011). Já no método de disco difusão, as cepas de *M. bovoculi* foram resistentes à enrofloxacin (9% - 1/10). Nas últimas décadas, tanto na literatura veterinária nacional como internacional, os dados de perfis de suscetibilidade de *Moraxella* spp., são anteriores a discriminação de *M. bovoculi* e portanto, restringiram-se a estudos com *M. bovis* (WEBBER et al., 1982; SHRYOCK et al., 1998; ZIELINSKI et al., 2000; CONCEIÇÃO et al., 2004). Somente após a recente descrição de *M. bovoculi* (ANGELOS et al., 2007), um estudo realizado nos Estados Unidos avaliou a suscetibilidade aos antimicrobianos desta espécie (ANGELOS et al., 2011). Desta forma, este é o segundo estudo avaliando o perfil de suscetibilidade de *M. bovoculi*.

Em relação às cepas de *M. ovis*, 9% (1/11) apresentaram resistência à oxitetraciclina e 18% à penicilina (2/11) pelo método de microdiluição em caldo, já pelo método de disco difusão, 100% das cepas de *M. ovis* foram sensíveis aos dez fármacos testados. O único estudo de suscetibilidade aos antimicrobianos de *M. ovis* presente na literatura, se refere a isolados de bovinos e relata resistência apenas para a eritromicina (CATRY et al., 2007). Dados de suscetibilidade de *M. ovis* são escassos, uma das razões pode ser o fato deste patógeno não ser o agente primário na etiologia da enfermidade (DAGNALL, 1994). No entanto, é importante ressaltar que este é o primeiro relato de suscetibilidade de cepas de *M. ovis* oriundas de ovinos e que este agente etiológico também deve ser controlado através de antimicrobianos, a fim de evitar a exacerbação da lesão primariamente causada por *M. conjunctivae* e *C. psittaci* em ovinos (DAGNALL, 1994).

A oxitetraciclina é geralmente o antimicrobiano de primeira escolha para o tratamento de CI (ALEXANDER, 2010). Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos para esse fármaco podem ser visualizados na tabela 1. Valores de CIM consideravelmente menores dos encontrados neste estudo são relatados para *M. bovis* (SHRYOCK et al., 1998), *M. bovoculi* (ANGELOS et al., 2011) e *M. ovis* (CATRY et al., 2007). Apesar de a oxitetraciclina ser amplamente utilizada no tratamento de CI, apenas dois relatos de resistência de *M. bovis* foram descritos na literatura científica (SHRYOCK et al., 1998; SENTURK et al., 2007). No presente estudo, 20% das cepas de *M. bovis* e 9% de *M. ovis* foram resistentes à oxitetraciclina. Esse resultado sugere que o uso indiscriminado de oxitetraciclina no Brasil ao longo dos anos possa estar relacionado a seleção de cepas de *Moraxella* spp. resistentes a esse fármaco.

Neste trabalho, as três espécies de *Moraxella* apresentaram resistência para a penicilina. O alto índice de resistência encontrado para *M. bovis* (40%) pode em parte ser devido a ampla utilização deste antimicrobiano como terapia de eleição em outras enfermidades de bovinos, bem como, em tratamentos subconjuntivais (ALEXANDER, 2010). De forma semelhante, ANGELOS et al. (2011) observaram que cepas de *M. bovoculi* apresentaram os maiores índices de resistência à penicilina (12,3%), quando comparados aos demais antimicrobianos testados. A cloxacilina, outro antimicrobiano da classe dos betalactâmicos, apresentou valores de CIM consideravelmente altos (16 µg/ml a >32 µg/ml). Resultados semelhantes para a cloxacilina são relatados por WEBBER et al. (1982), nos quais cepas com altos valores de CIM, similares aos encontrados no presente estudo, foram consideradas resistentes.

A CIM₉₀ para *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* frente ao florfenicol foi de 1 µg/ml, 1 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente. Dentre as cepas analisados, não foi observada resistência a esse fármaco. Por outro lado, ANGELOS et al. (2011) encontraram um índice de 3,5% de resistência entre cepas de *M. bovoculi*. Valores de CIM₉₀ de florfenicol, similares aos encontrados no presente estudo, foram descritos para cepas de *M. bovis* isoladas na Argentina

(ZIELINSKI et al., 2000) e em cepas de *M. ovis* isoladas na Bélgica (CATRY et al., 2007). Assim como a oxitetraciclina, o florfenicol tem sido relatado como uma opção de tratamento efetiva contra CI bovina (ANGELOS et al., 2000; GOKCE et al., 2002), especialmente em casos em que *M. bovis* apresenta resistência à classe das tetraciclina (ANGELOS et al., 2000).

É interessante ressaltar que quatro cepas de *M. bovis*, as quais apresentaram valores de CIM mais elevados (16 µg/mL a ≥32 µg/mL) frente à cefoperazona e cloxacilina, são oriundas do mesmo surto de CI bovina ocorrido no ano de 2012 no sul do Brasil (dados não mostrados). As demais cepas de *M. bovis*, não oriundas desse surto, apresentaram valores de CIM inferiores para estes antimicrobianos (entre 0,06 e 8 µg/mL). Além disso, das quatro cepas isoladas desse surto, uma foi resistente à oxitetraciclina e as quatro cepas à penicilina. Esses resultados demonstram que as cepas circulantes neste surto apresentam um perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos similar, contudo, não há dados se estas cepas foram isoladas de animais que receberam tratamento prévio com estes fármacos. Portanto, principalmente nos locais em que essa enfermidade ocorre com maior frequência, é necessário utilizar antimicrobianos de forma prudente a fim de evitar a seleção de cepas resistentes.

Por meio da análise estatística foi possível verificar que para a maioria dos antimicrobianos a maior moda de CIM encontrada foi entre as cepas de *M. bovis*. Por sua vez, *M. bovoculi* apresentou a menor moda de CIM (Tabela 1). No método de disco difusão, para a ampicilina, cefoperazona, ceftiofur, cloxacilina, florfenicol e penicilina foi observada diferença entre os valores dos halos de inibição das três espécies de *Moraxella* ($p < 0,05$). Essa diferença pode ser justificada, uma vez que, as médias do diâmetro do halo de inibição encontradas entre as cepas de *M. bovis* são menores do que as médias de *M. ovis* e *M. bovoculi*, demonstrando sua menor sensibilidade (Tabela 2). A partir dos resultados obtidos no método de microdiluição em caldo e disco difusão é possível afirmar que existe diferença ($p < 0,05$) no perfil antimicrobiano de *M. bovis* em comparação com o perfil de *M. bovoculi* e *M. ovis*. Novos

estudos precisam ser realizados a fim de determinar o motivo pelo qual as cepas de *M. bovis* requerem maiores concentrações de antimicrobianos para serem inibidas. Contudo, visto que a virulência de um micro-organismo favorece a sua proliferação e sobrevivência no hospedeiro (LEVIN et al., 2000) é possível sugerir que *M. bovis* possui fatores de virulência, ainda não bem elucidados, que favorecem esse perfil de resistência.

A taxa de concordância por antimicrobiano e os erros entre o método de disco difusão e o teste de referência podem ser observadas na tabela 3. Para a maioria dos fármacos testados observou-se boa concordância geral entre o método teste e o método de referência (93,7 a 100%), exceto para a oxitetraciclina (84,3%) e à penicilina (78,1%). Ao analisar a concordância entre os métodos, em cada espécie de *Moraxella*, verificou-se que as menores porcentagens de concordância, assim como as maiores quantidades de erros, foram encontrados para as cepas de *M. bovis* em relação à penicilina e oxitetraciclina. Desta forma, o método de disco difusão quando utilizado na rotina laboratorial pode apontar falsa sensibilidade, o que merece atenção especial, uma vez que, a oxitetraciclina e penicilina são amplamente utilizadas no tratamento de CI (ALEXANDER, 2010). Por sua vez, para *M. bovoculi*, os métodos apresentaram boa concordância para todos os antimicrobianos testados (Tabela 3). Na literatura científica, estudos sobre a concordância de diferentes metodologias para a avaliação de suscetibilidade de *Moraxella* spp. não foram descritos até o momento, contudo, trabalhos com outros micro-organismos, como *Haemophilus influenzae*, *Nocardia asteroides*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, relatam boa correlação entre o método de disco difusão e microdiluição em caldo para a maioria dos fármacos testados (BARRY et al., 1988; AMBAYE et al., 1997; JACOBS et al., 1998; BURNS et al., 2000).

Atualmente, não existem critérios definidos pelo CLSI para a interpretação de CIM e halos de inibição para os fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por *Moraxella* spp., o que pode favorecer a ocorrência de falhas na comparação dos resultados

encontrados entre as duas metodologias. WEISS et al. (1996) relatam que ao utilizar critérios definidos para diferentes micro-organismos com o fim de correlacionar o método de disco difusão e o de referência, para a penicilina contra *Corynebacterium* spp., encontraram variações consideráveis entre os resultados das duas metodologias devido aos diferentes pontos de corte utilizados na interpretação dos resultados.

A tentativa de estabelecer uma análise de regressão linear entre a CIM e o diâmetro do halo de inibição foi possível somente para a cloxacilina, frente às cepas de *M. bovis* ($R^2 = 59,29\%$ $P < 0,0001$). Desta forma, pode-se inferir que na equação de regressão linear, a cada um milímetro de aumento no diâmetro do halo de inibição da cloxacilina reduz a CIM em 1,327 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1). Esses resultados podem ser limitados devido ao baixo número de cepas de *Moraxella* spp. estudadas. Métodos qualitativos, como o disco difusão, apesar de serem de fácil execução não são capazes de prever a CIM na prática laboratorial (CAMPANA et al., 2011), contudo, equações de regressão, como a apresentada neste estudo pode ser sugerida para estimar o valor de CIM de cloxacilina para *M. bovis* a partir de resultados do método de disco difusão.

CONCLUSÃO

As cepas de *M. bovis* analisadas neste estudo diferem das demais espécies de *Moraxella* spp. estudadas por apresentarem maiores concentrações de CIM e CBM, menores porcentagens de concordância e maiores quantidades de erros entre os métodos analisados. Esses resultados podem indicar a necessidade de definir pontos de corte direcionados às espécies de *Moraxella*. A partir dos resultados obtidos no teste *in vitro*, é possível apontar a ampicilina, ceftiofur, florfenicol, enrofloxacin e gentamicina como os fármacos para os quais as três espécies de *Moraxella* apresentaram o melhor perfil de sensibilidade. Os métodos avaliados são concordantes para a determinação da suscetibilidade das cepas de *Moraxella* spp. para maioria

dos antimicrobianos, exceto para a penicilina e oxitetraciclina, uma vez que, pode ocorrer situações de falsa sensibilidade no método de disco difusão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao professor Fabricio Rochedo Conceição da Universidade Federal de Pelotas e ao médico veterinário Charles Capinos Scherer da Hipra Saúde Animal, pela cedência de cepas de *Moraxella* spp. para este estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, D. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review of cases in clinical practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal**, v.26, p. 487–503, 2010.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072010000447>>.

Acesso em: 18 setembro. 2012. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.09.006.

AMBAYE, A. et al. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-Test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 847–852, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229688/>>. Acesso em: 01 agosto. 2013.

ANDREWS, M.J. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2726-2757, 2011. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/66/12/2726.long>>. Acesso em: 05 agosto. 2013. doi:10.1093/jac/dkr359.

ANGELOS, J.A. Efficacy of florfenicol for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.216, p. 62–

64, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638321>>. Acesso em: 11 abril. 2013.

ANGELOS, J.A.; BALL, L.M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other *Moraxella* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v.19, p.532-534, 2007.

Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/19/5/532.long>>. Acesso em: 20 novembro. 2012. doi: 10.1177/104063870701900511.

ANGELOS, J.A. et al. *Moraxella bovoculi* sp. nov. isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.7, p.789-795, 2007. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/content/57/4/789.long>>. Acesso em: 20 novembro. 2012. doi: 10.1099/ijs.0.64333-0.

ANGELOS, J.A. et al. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**, v.23, p.552, 2011. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/23/3/552.long>>. Acesso em: 29 março. 2013. doi: 10.1177/1040638711404154.

BAPTISTA, P.J.H.P. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **British Veterinary Journal**, v. 135, p.225-42, 1979.

BARRY, A. L. et al. Variability of clarithromycin and erythromycin susceptibility tests with *Haemophilus influenzae* in four different broth media and correlation with the standard disk diffusion test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2415-2420, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266903/pdf/jcm00083-0197.pdf>>. Acesso em: 01 agosto. 2013.

BAUER, A.W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707>>. Acesso em: 29 julho. 2012.

BURNS, L.J. et al. Comparison of Agar Diffusion Methodologies for Antimicrobial susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1818–1822, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86597/>>. Acesso em: 01 agosto.2013.

CAMPANA, H.E. et al. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 47, p. 157-164, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n2/v47n2a11.pdf>>. Acesso em: 29 julho.2013. doi: org/10.1590/S1676-24442011000200011.

CATRY, B.F.B. et al. A. Recovery of *Moraxella ovis* from the bovine respiratory tract and differentiation of *Moraxella* species by tDNA-intergenic spacer PCR. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.375–380, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506004366>>. Acesso em: 14 abril. 2013. doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.031.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved Standard – 4.ed.** Wayne, PA, 2013. (CLSI document VET01-A4 Clinical and Laboratory Standards Institute).

CONCEIÇÃO, F.R. et al. Antibiotic susceptibility of *Moraxella bovis* recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil and Uruguay between 1974 and 2001. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.364-366, 2004. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822004000300018&script=sci_abstract>.

Acesso em: 29 março. 2013. doi: org/10.1590/S1517-83822004000300018.

DAGNALL, G.J. The role of *Branhamella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydia psittaci* in conjunctivitis of sheep. **British Veterinary Journal**, v.150, p.65-71, 1994.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8025837>>. Acesso em: 11 abril. 2013.

ELAD, D. et al. *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.35, p.431–434,1988. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00516.x/abstract>>. Acesso em: 20 novembro. 2012. doi: 10.1111/j.1439-0450.1988.tb00516.

LIBARDONI, F. et al. *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p. 743-746, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v32n8/v32n8a11.pdf>>. Acesso em: 09 setembro. 2012. doi: 10.1590/S0100-736X2012000800011.

GOKCE, H.I. et al. Comparison of the efficacy of florfenicol and oxytetracycline in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratitis. **Irish Veterinary Journal**, v.55, p.573–576, 2002. Disponível em: <http://abs.kafkas.edu.tr/upload/126/A_comparison_of_the_efficacy_of_florfenicol_and_oxytetracycline_in_the_treatment_of_naturally_occurring_infectious_bovine_keratoconjunctivitis.pdf>. Acesso em: 07 abril.2013. doi: 10.1017/S146625230700120X.

HENSON, J.B.; GRUMBLES, L.C. Infectious bovine keratoconjunctivitis. I. Etiology. **American Journal Veterinary Research**, v.21, p.761–766, 1960.

JACOBS, R. M. et al. Determination of penicillin MICs for *Streptococcus pneumonia* by using a two- or three-disk diffusion procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 179–183, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124830/>>. Acesso em: 02 agosto.2013.

LEVIN, B.R.; PERROT, V.; WALKER, N. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptative evolution in bacteria. **Genetic**, v. 154, p. 985-997, 2000.

Disponível: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1460977/>>. Acesso em: 19 junho.2013.

McCONNEL, C.S.; SHUM, L.; HOUSE, J.K. Antimicrobial susceptibility of Australian bovine *Moraxella* isolates. **Australian Veterinary Journal**, v.85, p. 70-71, 2007. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2006.00108.x/abstract>>. Acesso em: 29 março.2013. doi: 10.1111/j.1751-0813.2006.00108.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Testes for Identification of Medical Bacteria**. Philadelphia: Lippincott, 2000. 912p.

NIELSEN, E. I. Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 128-136, 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797646/>>. Acesso em: 16 junho.2013. doi: 10.1128/AAC.00604-06.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 999p.

SAS. **Statistical analysis system user's guide: statistics**. Version 9.2, Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 1686p.

SENTURK, S. et al. Evaluation of the clinical efficacy of subconjunctival injection of clindamycin in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis.

Veterinary Ophthalmology, v.10, p.186–189, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1463-5224.2007.00536.x/abstract>>. Acesso em: 10 janeiro. 2013. doi: 10.1111/j.1463-5224.2007.00536.x.

SHRYOCK, T.R. et al. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.61, p.305-309, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>

/science/article/pii/S0378113598001916>. Acesso em: 29 março. 2013. doi: 10.1016/S0378-1135(98)00191-6.

ZIELINSKI, G. et al. Antibiotic sensitivity of an Argentine strain collection of *Moraxella bovis*. **Veterinary Therapy**, v.1, p.199-204, 2000.

WEBBER, J.J. et al. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis* determined by agar disk diffusion and broth microdilution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, p. 554-557, 1982. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/21/4/554.long>>. Acesso em: 10 janeiro. 2013.

WEISS, K. et al. Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 930–933, 1996. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163233/pdf/400930.pdf>>. Acesso em: 01 agosto.2013.

Tabela 1 - Número de cepas de *Moraxella* spp. com as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM, CIM₅₀, CIM₉₀, CBM₅₀ e CBM₉₀), moda/CIM e resistência frente aos antimicrobianos testados.

Agente antimicrobiano	Número de cepas com CIM (µg/mL)															CIM ₅₀	CIM ₉₀	CBM ₅₀	CBM ₉₀	Moda - CIM (µg/mL)	% Resistência
	<i>Moraxella bovis</i> (n=10)																				
	≤0,015	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32							
Ampicilina	4				1	2		1	2				*		0,125	2	0,125	2	0,015	0,0	
Cefoperazona				1					2	2	1		3	1	4	32	4	32	32	†	
Ceftiofur	2		1		3			3		1	*				0,125	1	0,125	2	0,125	0,0	
Cloxacilina				1			1	1	2	1			1	1	2	>32	2	>32	32	†	
Enrofloxacina	4		3	2	1				*						0,03	0,06	0,06	0,06	0,0156	0,0	
Florfenicol					1			3	6				*		1	1	1	1	1	0,0	
Gentamicina	2			2	2	2		2					*		0,125	1	0,125	1	0,0156	0,0	
Neomicina			1	1	2	2	2	3	1						0,5	1	1	2	1	†	
Oxitetraciclina					1	3	2	2					2*		0,5	8	0,25	2	0,25	20,0	
Penicilina	1			1	2	2		2*	2						0,25	2	0,25	2	0,125	40,0	
Agente antimicrobiano	<i>Moraxella bovoculi</i> (n=11)															CIM ₅₀	CIM ₉₀	CBM ₅₀	CBM ₉₀	Moda-CIM (µg/mL)	% Resistência
	≤0,015	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32							
	Ampicilina	10								1				*							
Cefoperazona			1			4	2	1		1		1			0,25	4	1	4	0,25	†	
Ceftiofur	9		1	1							*				<0,015	0,03	<0,015	0,03	0,0156	0,0	
Cloxacilina	1		1	4	1	1	1							2	0,06	>32	0,125	>32	0,0625	†	
Enrofloxacina	1		5	3				1	*						0,03	1	0,06	0,125	0,0312	0,0	
Florfenicol				1	1	3	4	2			*				0,5	1	1	1	0,25	0,0	
Gentamicina						1	6	3		1			*		0,5	1	0,5	2	0,5	0,0	
Neomicina							3	6	2						1	2	2	2	1	†	
Oxitetraciclina						5	4	2					*		0,5	12	2	2	0,25	0,0	
Penicilina	10							1*							<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	0,0156	9,0	
Agente antimicrobiano	<i>Moraxella ovis</i> (n=11)															CIM ₅₀	CIM ₉₀	CBM ₅₀	CBM ₉₀	Moda-CIM (µg/mL)	% Resistência
	≤0,015	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32							
	Ampicilina	10		1					1	3	3	1	1		*						
Cefoperazona						1									4	16	8	16	2	†	
Ceftiofur	3		1	3	2	1		1			*				0,06	0,25	0,06	0,25	0,015	0,0	
Cloxacilina	1					2	3	4							0,5	1	2	4	1	†	
Enrofloxacina	1		3	3	4				*						0,06	0,125	0,25	0,25	0,125	0,0	
Florfenicol								5	2	4			*		1	2	1	2	0,5	0,0	
Gentamicina						1	6	4					*		0,5	1	1	1	0,5	0,0	
Neomicina							2	7	2						1	2	1	2	1	†	
Oxitetraciclina							7	1	1	1	1*				0,5	4	2	8	0,5	9,0	
Penicilina	9						2*								<0,015	0,5	<0,015	0,5	0,0156	18,0	

† Resistência não calculada para esses antimicrobianos.

Tabela 2 - Média dos halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão para 32 cepas de *Moraxella* spp.

	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella ovis</i>	P*
ATM	Média/faixa de variação (mm)	Média/faixa de variação (mm)	Média/faixa de variação (mm)	
AMP	30,3 (24-42) ^b	38 (32-42) ^a	39,1 (32-42) ^a	0,014
CFP	23 (14-30) ^b	28,8 (22-34) ^a	26,1 (20-40) ^{ab}	0,040
CFT	27,7 (18-38) ^b	34,6 (30-40) ^a	33 (30-40) ^a	0,012
CLX	13,9 (0-12) ^b	23,8 (18-30) ^a	23,5 (17-32) ^a	0,003
ENO	27,9 (20-36)	27,8 (16-36)	30,3 (22-42)	0,525
FLF	30,6 (20-40) ^b	30,4 (26-34) ^b	34,4 (28-40) ^a	0,027
GEN	22,4 (14-30)	20,4 (14-26)	23 (21-30)	0,052
NEO	20,6 (16-26)	20 (14-26)	22,1 (19-28)	0,184
OXT	25 (16-30)	25,8 (22-30)	28,9 (22-42)	0,281
PEN	28,6 (16-42) ^b	36 (32-42) ^a	36,5 (30-42) ^a	0,160

ATM: antimicrobiano; AMP: ampicilina; CFP: cefoperazona; CFT: ceftiofur; CLX: cloxacilina; ENO: enrofloxacina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NEO: neomicina; OXT: oxitetraciclina; PEN: penicilina.

* probabilidade: indica que as diferenças não se devem ao acaso para $P \leq 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de *Bonferroni* ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Concordância e erros dos resultados do método de disco difusão e o método de referência (microdiluição em caldo) para as cepas de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*.

<i>M. bovis</i> (n=10)											
		AMP	CFP	CFT	CLX	ENO	FLF	GEN	NEO	OXT	PEN
Disco difusão	S	10	†	8	†	9	10	9	†	9	6
	I	0	†	2	†	1	0	1	†	1	3
	R	0	†	0	†	0	0	0	†	0	1
Microdiluição em caldo	S	10	†	9	†	10	10	10	†	8	6
	I	0	†	1	†	0	0	0	†	0	0
	R	0	†	0	†	0	0	0	†	2	4
% Concordância		100	†	90	†	90	100	90	†	80	60
Erros leves		0	†	1	†	1	0	1	†	1	3
Erros graves		0	†	0	†	0	0	0	†	0	0
Erros muito graves		0	†	0	†	0	0	0	†	2	1
<i>M. bovoculi</i> (n=11)											
Disco difusão	S	11	†	11	†	10	11	10	†	11	11
	I	0	†	0	†	0	0	1	†	0	0
	R	0	†	0	†	1	0	0	†	0	0
Microdiluição em caldo	S	11	†	11	†	11	11	11	†	11	10
	I	0	†	0	†	0	0	0	†	0	0
	R	0	†	0	†	0	0	0	†	0	1
% Concordância		100	†	100	†	90,9	100	90,9	†	100	90,9
Erros leves		0	†	0	†	0	0	1	†	0	0
Erros graves		0	†	0	†	1	0	0	†	0	0
Erros muito graves		0	†	0	†	0	0	0	†	0	1
<i>M. ovis</i> (n=11)											
Disco difusão	S	11	†	11	†	11	11	10	†	11	11
	I	0	†	0	†	0	0	0	†	0	0
	R	0	†	0	†	0	0	0	†	0	0
Microdiluição em caldo	S	11	†	11	†	11	11	11	†	9	9
	I	0	†	0	†	0	0	0	†	1	0
	R	0	†	0	†	0	0	0	†	1	2
% Concordância		100	†	100	†	100	100	100	†	81,8	81,8
Erros leves		0	†	0	†	0	0	0	†	1	0
Erros graves		0	†	0	†	0	0	0	†	0	0
Erros muito graves		0	†	0	†	0	0	0	†	1	2
% Concordância geral (n=32)		100	†	96,8	†	93,7	100	93,7	†	84,3	78,1

ATM: antimicrobiano; AMP: ampicilina; CFP: cefoperazona; CFT: ceftiofur; CLX: cloxacilina; ENO: enrofloxacin; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NEO: neomicina; OXT: oxitetraciclina; PEN: penicilina. † Resistência não calculada para esse antimicrobiano.

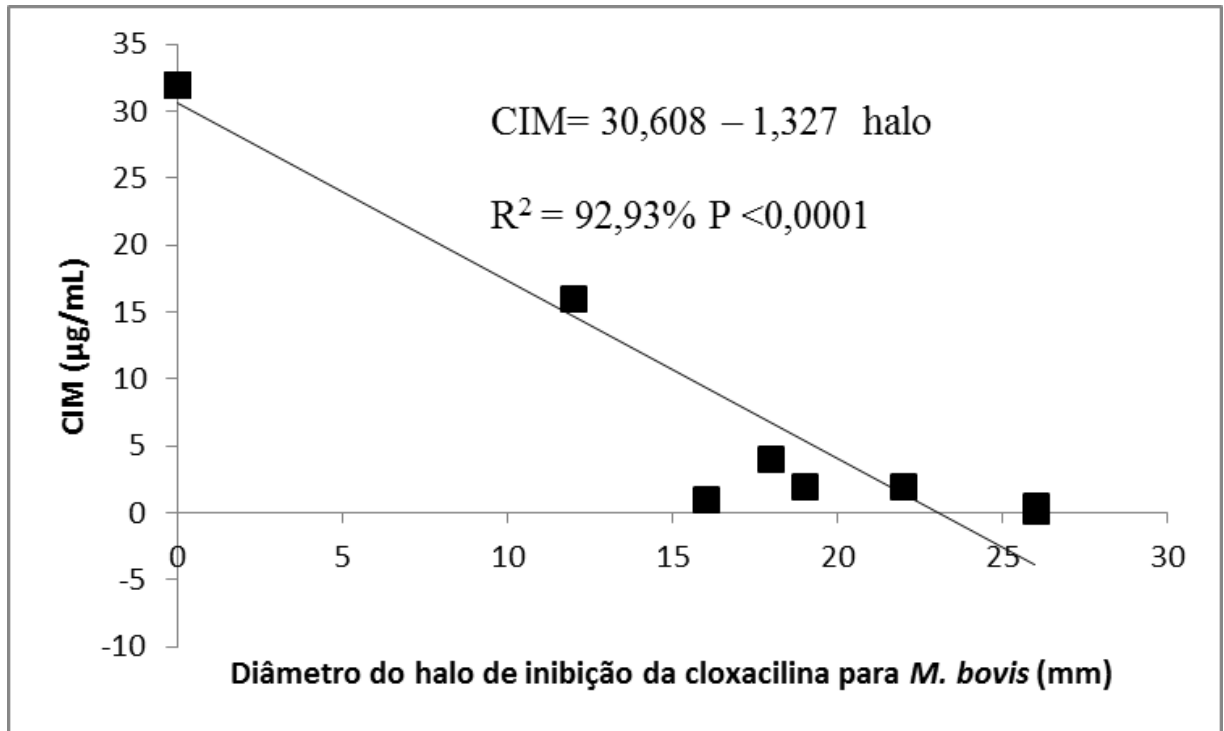


Figura 1 - Representação gráfica da CIM e do diâmetro do halo de inibição da cloxacilina para *M. bovis*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cepas de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* são suscetíveis a maioria dos antimicrobianos testados pelos métodos de microdiluição em caldo e disco difusão.

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *M. bovis* é diferenciado, uma vez que as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas foram superiores quando comparadas aos valores obtidos para *M. bovoculi* e *M. ovis*.

A variação dos valores de CIM encontrados para as espécies de *Moraxella* spp. estabelecem a necessidade de conhecer o perfil antimicrobiano das cepas circulantes em determinada região.

É possível apontar a ampicilina, ceftiofur, florfenicol, enrofloxacin e a gentamicina como antimicrobianos para os quais as três espécies de *Moraxella* testadas apresentaram o melhor perfil de sensibilidade por meio de microdiluição em caldo. Desta forma, sugerimos que estudos farmacocinéticos e de eficácia clínica sejam realizados a fim de determinar a eficácia terapêutica destes fármacos.

Apesar da boa concordância observada para a maioria dos antimicrobianos, as discrepâncias observadas para a oxitetraciclina e penicilina sugerem que as avaliações de suscetibilidade para *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* continuem sendo realizadas por microdiluição em caldo em laboratórios de referência.

A resistência à oxitetraciclina e penicilina, amplamente utilizadas no tratamento de CI, alerta para o uso racional desses fármacos na terapia antimicrobiana em medicina veterinária.

5 REFERÊNCIAS

ÅKERSTEDT, J.; HOFSHAGEN, M. Bacteriological investigation of infectious keratoconjunctivitis in Norwegian sheep. **Acta Veterinary Scandinava**, v. 45, p. 19-26, 2004.

ALLEN, J.L. et al. Effect of penicillin or penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 206, p. 1200-1203, 1995.

ANGELOS, J.A. Efficacy of florfenicol for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.216, p. 62–64, 2000.

ANGELOS, J.A. et al. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.8, p.1222-1228, 2001.

ANGELOS, J.A.; BALL, L.M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other *Moraxella* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v.19, p.532-534, 2007.

ANGELOS, J.A. *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis: Cause or coincidence?. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, p.73-78, 2010.

ANGELOS, J.A. et al. Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Research Communication**, v.34, p.229–239, 2010.

ANGELOS, J.A. et al. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**, v.23, p.552, 2011.

ARAÚJO, F.L.; RICCIARDI I.D. Atividade biológica do lipopolissacarídeo (LPS) de *Moraxella bovis*. **Review of Microbiology**, v.19, p.266-270, 1988.

BAPTISTA, P.J.H.P. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **British Veterinary Journal**, v. 135, p.225–42, 1979.

BAPTISTA, P.J.H.P.; RIBEIRO, L.A.O. Querato-conjuntivite infecciosa dos bovinos no Rio Grande do Sul. **Atualidades Veterinárias**, v.3, p.10-15, 1974.

BROWN, M.H. et al. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.12, p.259–266, 1998.

CATRY, B.F.B. et al. Recovery of *Moraxella ovis* from the bovine respiratory tract and differentiation of *Moraxella* species by tDNA-intergenic spacer PCR. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.375–380, 2007.

CONCEIÇÃO, F.R. et al. Antibiotic susceptibility of *Moraxella bovis* recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil and Uruguay between 1974 and 2001. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.364-366, 2004.

DAGNALL, G.J. The role of *Branhamella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydia psittaci* in conjunctivitis of sheep. **British Veterinary Journal**, v.150, p.65-71, 1994.

ELAD, D. et al. *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. **Journal of Veterinary Medicine**, v.35, p.431–434, 1988.

EASTMAN, G. T. et al. Combined parenteral and oral administration of oxytetracycline for control of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, p.560-563, 1998.

FUNK, L. et al. A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. **Vaccine**, v.27, p.4585–4590, 2009.

GEEM, T.V.; BROCE, A.B. Significance of cattle discharges and secretions as protein sources for ovarian development in the face fly (*Diptera: muscidae*). **Environment Entomology**, v.14, p.60–64, 1985.

GIL TURNES, C.; ARAÚJO, F.L. Serological characterization of strains of *Moraxella bovis* using double immunodiffusion. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.165-168, 1982.

GIL TURNES, C. Hemagglutination, autoagglutination and pathogenicity of *Moraxella bovis* strains. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.47, p.503-504, 1983.

GIL TURNES, C.; ALBUQUERQUE, I.M.B. Serotypes and antibiotic sensitivity of *Moraxella bovis* isolated from an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.428-430, 1984.

GIL TURNES, C. Ceratoconjuntivite bovina infecciosa. In: RIET-CORREA, F. et al. Doenças de Ruminantes e Equinos. São Paulo: Varela, 2001. v.1.

GOKCE, H.I. et al. Comparison of the efficacy of florfenicol and oxytetracycline in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratitis. **Irish Veterinary Journal**, v.55, p.573-576, 2002.

GOULD, S. et al. Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious bovine keratoconjunctivitis in dairy calves. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.108-115, 2013.

HENSON, J.B.; GRUMBLES, L.C. Infectious bovine keratoconjunctivitis. I. Etiology. **American Journal Veterinary Research**, v.21, p.761-766, 1960.

HUGHES, D.E.; PUGH, G.W. A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.157, p.443-51, 1970.

KEIZER, D.W. et al. Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.26, p.24186-24193, 2001.

LIBARDONI, F. et al. *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p. 743-746, 2012.

MATTICK, J.S.; WHITCHURCH, C.B. The molecular genetics of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. **Gene**, v.179, p.147-155, 1996.

McCONNEL, C.S. et al. Antimicrobial susceptibility of Australian bovine *Moraxella* isolates. **Australian Veterinary Journal**, v.85, p. 70-71, 2007.

MOORE, L.S.; LEPPER, A.W.D. A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.29, p.75-83, 1991

NAGLIC, T. et al. Mycoplasmas associated with bovine conjunctivitis and keratoconjunctivitis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.4, p. 21-24, 1996.

O'CONNOR, A.M. et al. A Randomized clinical trial evaluating a farm-of-origin autogenous *Moraxella bovis* vaccine to control infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye) in beef cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.1447–1453, 2011.

O'CONNOR, A.M. et al. Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (*pinkeye*). **Veterinary Microbiology**, v.155, p.374–380, 2012.

POSTMA, C.G. et al. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.31, p. 449–458, 2008.

PUGH, G. W.; HUGHES, D. The isolation and characterization of *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.27, p.957-962, 1966.

PUGH, G.W.; MCDONALD, T.J. Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.2343–5, 1986.

RUFFOLO, C.G. et al. Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. **Infection and Immunity**, v.65, n.1, p.339-343, 1997.

SHRYOCK, T.R. et al. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.61, p.305-309, 1998.

SLATTER, D.H. et al. A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.65–8, 1982.

SNOWDER, G.D. et al. Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in pre weaned beef calves. **Journal of Animal Science**, v.83, p.507–18, 2005.

SPRADBROW, P.B. Experimental infection of the ovine cornea with *Neisseria ovis*. **Veterinary Record**, v. 88, p.615-616, 1971.

STEVE, P.C.; LILLY, J.H. Investigations on transmissibility of *Moraxella bovis* by the face fly. **Journal of Economic Entomology**, v.58, p.444–446, 1965.

VOGELWEID, C.M. et al. Scanning electron microscopy of bovine corneas irradiated with sunlamps and challenge exposed with *Moraxella bovis*. **American Journal Veterinary Research**, v.47, p. 378–384, 1986.

ZIELINSKI, G. et al. Antibiotic sensitivity of an Argentine strain collection of *Moraxella bovis*. **Veterinary Therapy**, v.1, p.199-204, 2000.

WEBBER, J.; SELBY, L. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.179, p.823–6, 1981.

WEBBER, J.J. et al. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis* determined by agar disk diffusion and broth microdilution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, p. 554-557, 1982.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Perfis de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* aos antimicrobianos obtidos por disco difusão em ágar e microdiluição em caldo.

Cepa <i>Moraxella bovis</i>	Antimicrobianos													
	AMP		CFT		ENO		FLF		GEN		OXT		PEN	
	DD	M C	DD	MC	DD	MC	DD	M C	DD	MC	DD	MC	DD	MC
147	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SBP 111/12 T939 05/327	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
SBP 111/12 889T	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S
SBP111/12 n. 3	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	I	S	R	R
SBP 111/12 n. 2 Torres	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R
SB 24/90	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2439	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 82/92	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R
<i>Moraxella bovoculi</i>														
SB 156/96	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Alegrete	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 163/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 15/10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 150/02	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S
Jackson	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Itapuã	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 57/12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Viviane	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 296/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 15/13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>M. ovis</i>														
SB 07/13 n. 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nunes	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Água doce	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 07/13 n.1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 567/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 07/13 n.3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SB 247/92	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
SB 249/92 n.6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
SB 07/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
SB 06/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SB 326/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP: ampicilina; CFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; OXT: oxitetraciclina; PEN: penicilina.

DD: disco difusão MC: microdiluição em caldo

S: sensível I: intermediário R: resistente

APÊNDICE B – Identificação e origem das cepas de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* conforme registros do Laboratório de Bacteriologia da UFSM.

<i>M. bovis</i>		<i>M. bovoculi</i>		<i>M. ovis</i>	
Identificação	Origem	Identificação	Origem	Identificação	Origem
SB 24/90	São Martinho da Serra-RS	SB156/96	Lavras do Sul	SB 567/05	Santa Maria
TORRES	Pelotas-RS	SB 163/03	Formigueiro	SB 06/08	Caçapava do Sul
SBP111/12 T939	Dom Pedrito-RS	SB 15/13	Caçapava do Sul	SB 326/07	-
SBP 111/12 889T	Dom Pedrito-RS	Alegrete	Alegrete	SB 07/08	São Sepé
SBP111/12 (3)	Dom Pedrito-RS	SB 150/02 n°5	Tupanciretã	SB 07/13 n°3	São Sepé
SBP 111/12 (2)	Dom Pedrito-RS	Itapuã	Itapuã	SB 07/13 n°2	São Sepé
SB 82/92	Dilermando de Aguiar-RS	SB 296/07	-	SB 07/13 n° 1	São Sepé
2439	Pelotas	Viviane	Pelotas	Água doce	-
147	Pelotas	Jackson	-	Nunes	-
05/329	Pelotas	SB 57/12 (8127)	Minas Gerais	SB 247/92	-
ATCC <i>M. bovis</i>	Número: 10900	SB 15/10	Pelotas	SB 249/92 n°6	Cruz Alta
		ATCC <i>M. bovoculi</i>	Número: BAA1259	ATCC <i>M. ovis</i>	Número: 19575

APÊNDICE C – Concentração inibitória mínima (CIM- µg/ml) e concentração bactericida mínima (CBM- µg/ml) de *Moraxella bovis* frente a dez agentes antimicrobianos.

	<i>Moraxella bovis</i>																			
	PEN		NEO		FLF		OXT		GEN		ENO		AMP		CFP		CLX		CFT	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
ATCC	0,25	0,25	1	1	1	1	0,25	1	1	2	0,031	0,062	0,125	0,125	8	1	0,125	0,25	<0,015	<0,015
<i>M. bovis</i>																				
Torres	0,125	0,25	0,25	0,5	1	2	8	16	1	4	0,062	0,125	0,25	0,25	32	32	2	2	0,031	0,125
2439	0,125	0,125	1	1	0,125	0,125	0,25	0,25	<0,015	0,015	0,031	0,031	<0,015	<0,015	2	2	2	2	0,125	0,125
05/327	0,062	0,0625	1	1	1	1	0,25	0,25	0,25	0,125	0,031	0,062	<0,015	<0,015	2	2	0,5	0,5	0,125	0,125
147	0,25	0,25	2	2	0,5	0,5	0,25	0,25	1	1	0,062	0,062	0,125	0,125	4	4	4	4	0,125	0,125
SB 24/90	<0,015	<0,015	1	2	0,5	1	1	1	0,25	0,5	0,125	0,062	<0,015	<0,015	0,063	0,125	0,125	0,125	<0,015	0,015
SBP 111/12	0,25	0,25	0,25	2	1	2	0,5	4	0,125	0,125	<0,015	0,062	0,25	0,5	>32	>32	>32	>32	4	8
889T																				
SBP 111/12	2	2	0,5	1	1	2	8	8	0,0625	0,125	<0,015	0,031	2	1	32	>32	32	32	1	1
n. 2																				
SBP 111/12	1	1	0,5	0,5	1	2	1	2	0,125	0,25	<0,015	<0,012	2	2	4	4	>32	>32	1	2
n. 3																				
SB 82/92	2	8	0,06	0,063	0,5	0,5	0,125	0,25	0,0625	0,0625	0,031	0,062	<0,015	0,03125	8	16	1	1	<0,015	<0,015
SB 111/12	1	2	0,12	0,25	1	2	0,5	0,5	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	1	2	32	32	16	32	1	1
T939																				

AMP: ampicilina; CFP: cefoperazona; CFT: ceftiofur; CLX: cloxacilina; ENO: enrofloxacin; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NEO: neomicina; OXT: oxitetraciclina; PEN: penicilina

APÊNDICE D – Concentração inibitória mínima (CIM- µg/ml) e concentração bactericida mínima (CBM- µg/ml) de *Moraxella bovoculi* frente a dez agentes antimicrobianos.

	<i>Moraxella bovoculi</i>																			
	PEN		NEO		FLF		OXT		GEN		ENO		AMP		CFP		CLX		CFT	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
ATCC <i>M. bovoculi</i>	1	1	2	2	0,5	0,5	0,25	1	0,5	0,5	0,125	0,125	1	2	1	1	4	4	0,0625	0,125
SB15/10	<0,01	<0,015	1	4	0,5	1	0,5	1	1	2	<0,015	0,0625	<0,015	<0,015	0,5	1	0,125	0,125	<0,015	<0,015
Itapuã	<0,01	<0,015	0,5	1	0,25	0,25	0,5	2	4	4	0,0625	0,125	<0,015	<0,015	0,031	0,062	0,062	0,25	<0,015	<0,015
SB 296/07	<0,01	<0,015	1	2	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,0312	0,03125	<0,015	<0,015	0,25	0,25	<0,015	<0,015	0,0156	0,0312
SB 15/13	<0,01	<0,015	0,5	0,5	0,0625	0,0625	0,25	0,25	0,5	0,5	0,0312	<0,015	<0,015	<0,015	0,25	0,125	0,062	0,062	<0,015	<0,015
Alegrete	<0,01	<0,015	1	1	0,25	0,25	0,25	1	0,5	0,5	0,0312	0,0625	<0,015	<0,015	0,5	1	0,062	0,062	<0,015	<0,015
SB 57/12	<0,01	<0,015	1	2	0,25	0,25	0,25	2	0,5	0,5	0,0312	0,03125	<0,015	<0,015	1	1	>32	>32	0,0625	0,25
SB 150/02 n.5	<0,01	<0,015	0,5	0,5	0,125	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,0312	0,03125	<0,015	<0,015	0,125	1	0,5	1	0,0312	0,0312
Jackson	<0,01	<0,015	2	2	1	1	0,5	2	1	1	0,0625	0,0625	<0,015	<0,015	4	4	0,25	0,25	<0,015	<0,015
Viviane	<0,01	<0,015	1	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0625	0,0625	<0,015	<0,015	0,25	0,25	0,0625	0,0625	<0,015	<0,015
SB 156/96	1	1	2	4	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	16	16	>32	>32	<0,015	<0,015
SB166/03	<0,01	<0,015	1	1	0,5	1	1	2	0,5	0,25	0,0312	0,03125	<0,015	<0,015	0,25	0,25	0,031	0,031	<0,015	<0,015

AMP: ampicilina; CFP: cefoperazona; CFT: ceftiofur; CLX: cloxacilina; ENO: enrofloxacin; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NEO: neomicina; OXT: oxitetraciclina; PEN: penicilina

APÊNDICE E – Concentração inibitória mínima (CIM- µg/ml) e concentração bactericida mínima (CBM- µg/ml) de *Moraxella ovis* frente a dez agentes antimicrobianos.

	<i>Moraxella ovis</i>																			
	PEN		NEO		FLF		OXT		GEN		ENO		AMP		CFP		CLX		CFT	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
ATCC <i>M.ovis</i>	0,015	0,015	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,0625	0,0625	<0,015	<0,015	1	4	0,125	0,125	0,0625	0,0625
SB 07/13 n°3 Nunes	<0,015	<0,015	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0312	0,0312	<0,015	<0,015	32	32	0,5	0,5	0,0312	0,0312
SB 567/05	<0,015	<0,015	1	1	2	1	0,5	8	0,5	1	0,0625	0,25	<0,015	<0,015	2	16	0,25	1	<0,015	<0,015
Água Doce	<0,015	<0,015	2	2	0,5	0,5	0,5	2	1	1	0,125	0,125	<0,015	<0,015	16	16	1	1	0,25	0,25
SB 247/92	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	2	0,5	1	0,0312	0,0312	<0,015	<0,015	0,25	0,5	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
SB 249/92 n°6	0,5	0,5	1	2	1	1	0,5	2	0,5	2	<0,015	0,0312	<0,015	<0,015	1	4	0,25	0,25	<0,015	0,0625
SB 07/08	<0,015	<0,015	1	1	2	2	4	4	0,5	0,5	0,125	0,125	<0,015	<0,015	4	4	1	0,5	0,0625	0,0625
SB 06/08	<0,015	<0,015	0,5	0,5	2	2	8	8	0,25	0,25	0,125	0,125	<0,015	<0,015	8	16	0,5	0,5	0,125	0,125
SB 07/13 n°2	<0,015	<0,015	1	1	2	4	1	4	1	1	0,0625	0,125	<0,015	<0,015	4	8	1	2	0,125	0,125
SB 326/07	<0,015	<0,015	2	2	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,125	0,125	0,0312	<0,015	4	4	16	16	0,0625	0,0625
SB 07/13 n°1	<0,015	<0,015	1	4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0625	0,0625	<0,015	<0,015	2	4	0,5	0,5	0,0625	0,0625

AMP: ampicilina; CFP: cefoperazona; CFT: ceftiofur; CLX: cloxacilina; ENO: enrofloxacin; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; NEO: neomicina; OXT: oxitetraciclina; PEN: penicilina

APÊNDICE F – Diâmetro do halo de inibição das cepas de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* frente aos dez antimicrobianos testados.

	Diâmetro do halo de inibição (milímetros)									
	GEN	CFT	ENO	FLF	PEN	NEO	AMP	CLX	OXT	CFP
<i>M. bovis</i>										
147	24	28	30	30	30	20	34	18	26	26
SBP 111/12 T939	20	30	22	28	28	22	30	12	30	22
05/327	30	34	36	40	42	26	40	26	24	30
SBP 111/12 889T	22	20	28	30	20	20	26	R	22	18
SBP 111/12 n. 3	14	18	20	20	16	16	20	R	16	14
SBP 111/12 n. 2	23	21	29	32	18	19	25	R	24	20
Torres	22	30	29	32	34	20	37	19	30	26
SB 24/90	20	30	28	30	40	20	40	26	26	24
24/39	28	38	36	40	40	26	42	22	28	30
SB 82/92	28	28	28	32	18	24	24	16	30	20
Varição	14-30	18-38	20-36	20-40	16-42	16-26	24-42	0- 12	16-30	14-30
<i>M. bovoculi</i>										
SB 156/96	20	30	30	30	36	18	38	30	24	30
Alegrete	26	36	28	32	42	24	42	26	26	30
SB 163/03	20	34	30	30	38	20	40	20	26	24
SB15/10	22	30	24	30	32	18	32	22	20	22
SB 150/02	14	30	16	30	24	14	30	18	30	34
Jackson	20	32	26	26	34	20	38	22	30	28
Itapuã	20	38	26	30	32	18	40	28	26	32
SB 57/12	22	36	30	30	40	20	40	24	26	30
Viviane	20	40	32	34	42	26	38	20	22	28
SB 297/07	20	36	26	28	42	18	32	30	22	30
SB 15/13	20	40	36	32	40	22	42	28	28	30
Varição	14-26	30-40	16-36	26-34	32-42	14-26	32 - 42	18-30	22-30	22-34
<i>M. ovis</i>										
SB 07/13 n.2	22	30	28	28	30	20	40	22	26	22
Nunes	24	32	30	32	34	24	42	32	30	28
Água doce	22	32	30	32	34	22	40	20	26	20
SB 07/13 n.1	22	38	30	36	38	20	40	24	28	24
567/05	21	36	22	39	38	22	40	23	30	26
SB 07/13 n.3	26	38	38	40	42	28	40	26	30	30
SB 247/92	21	33	29	34	37	21	39	26	22	30
SB 249/92 n.6	22	28	30	30	38	24	40	24	22	22
SB07/08	21	31	28	34	36	20	38	21	36	20
SB06/08	22	25	27	30	33	19	32	17	26	26
SB 326/07	30	40	42	40	42	24	40	24	42	40
Varição	21- 30	30- 40	22-42	28-40	30-42	19-28	32 - 42	17-32	22-42	20-40