

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

Valessa Lunkes Ely

Moraxella bovis, *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi*: **FORMAÇÃO DE
BIOFILME E ATIVIDADE DA LISOZIMA**

Santa Maria, RS
2018

Valessa Lunkes Ely

***Moraxella bovis, Moraxella ovis e Moraxella bovoculi: FORMAÇÃO DE
BIOFILME E ATIVIDADE DE LISOZIMA***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sônia de Avila Botton

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Agueda Castagna de Vargas

Santa Maria, RS
2018

Valessa Lunkes Ely

***Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi*: FORMAÇÃO DE
BIOFILME E ATIVIDADE DE LISOZIMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 07 de fevereiro de 2018:

Sônia de Avila Botton, Dr, UFSM
(Presidente/Orientadora)

Mateus Matiuzzi da Costa, Dr, UNIVASF

Letícia Trevisan Gressler, Dr, IFF/FW

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Ildo João Ely e Valéria Lunkes, por tornarem esse momento possível. Pelo exemplo, pelo amor, força e apoio incondicional.

À minha orientadora Sônia de Avila Botton, pela confiança, disponibilidade e carinho com que me orientou.

Aos professores que participaram de minha formação, em especial à professora Agueda Castagna de Vargas, pelo conhecimento compartilhado.

À toda a equipe do Laboratório de Bacteriologia, que dividiram comigo esta etapa. Um agradecimento especial aos que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela estrutura organizacional, e em especial pela qualidade de ensino e grandes mestres que proporcionou.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, em especial ao professor Mateus Matiuzzi da Costa, pela ajuda e por disponibilizar a estrutura e os equipamentos dos laboratórios para o desenvolvimento de importantes etapas da pesquisa.

RESUMO

Moraxella bovis, *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi*: FORMAÇÃO DE BIOFILME E ATIVIDADE DA LISOZIMA

AUTOR: Valessa Lunkes Ely

ORIENTADOR: Prof^ª Dr^ª. Sônia de Avila Botton

CO-ORIENTADOR: Prof^ª Dr^ª. Agueda Castagna de Vargas

Ceratoconjuntivite infecciosa (CI) é a enfermidade ocular mais importante em bovinos e ovinos. A doença representa significativas perdas econômicas em rebanhos no mundo inteiro, em decorrência de sua característica altamente contagiosa. O agente etiológico primário desta enfermidade é *Moraxella bovis*, porém *M. bovoculi* e *M. ovis* também têm sido recuperados de animais com a doença. A CI é documentada como sendo uma doença de portador, e esses animais possuem um papel fundamental na manutenção do micro-organismo em um rebanho. Todavia, ainda, não estão claros, quais fatores estão relacionados a capacidade de *Moraxella* spp. sobreviver na conjuntiva e na mucosa nasal de animais sem promover doença, bem como permanecer viável mesmo após o tratamento com dosagens elevadas de antimicrobianos. No presente estudo, abordou-se a formação de biofilme em *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* como fator associado à manutenção de animais na forma de portador. Adicionalmente, pesquisou-se a resistência de *Moraxella* spp. à lisozima, importante enzima antibacteriana, presente na lágrima e que atua como primeira linha de defesa a invasão da córnea por micro-organismos. A resistência dos micro-organismos frente à lisozima está associada à capacidade de conseguir aderir à córnea e promover a infecção. Nesta pesquisa, foi possível evidenciar que todos os isolados de *M. bovis* (15/54), *M. ovis* (21/54) e *M. bovoculi* (18/54) testados (54/54) foram capazes de formar biofilme e foram classificados quanto à intensidade de formação de biofilme. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) da lisozima foram determinadas para 33 isolados das três espécies de *Moraxella* em células planctônicas. Verificou-se que CIM e CBM foram bastante variáveis intraespécies, de 79,12 µg ml⁻¹ até valores superiores à 1266 µg ml⁻¹, não havendo diferença estatística na susceptibilidade à lisozima entre *Moraxella* spp. No entanto, quando testada em formas sésseis, a lisozima não apresentou capacidade de erradicar os biofilmes, porém promoveu uma redução na produção destes e nos biofilmes consolidados não houve diminuição após o acréscimo da lisozima, demonstrando não haver ação desta enzima em biofilmes previamente estabelecidos. Com os resultados obtidos neste estudo, é possível inferir que a capacidade de formação de biofilmes por *M. bovis*, *M. ovis* e *M. bovoculi* e a resistência às concentrações de lisozima, iguais ou superiores aos níveis fisiológicos da lágrima de bovinos e ovinos, pode estar ligada não apenas à capacidade de colonizar a conjuntiva, mas, também, permanecer neste local mesmo após a cura das lesões, na condição de indivíduo portador e servindo como um reservatório do agente etiológico da doença em um rebanho.

Palavras-chave: Ceratoconjuntivite infecciosa; Resposta inata; Bactéria; *Moraxella* spp.

ABSTRACT

Moraxella bovis, *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi*: BIOFILM FORMATION AND LYSOZYME ACTIVITY

AUTHOR: Valessa Lunkes Ely

ADVISOR: Prof^ª Dr^ª. Sônia de Avila Botton

CO-ADVISOR: Prof^ª Dr^ª. Agueda Castagna de Vargas

Infectious keratoconjunctivitis (IK) is the most important ocular disease in cattle and sheep. The disease represents significant economic losses in herds worldwide, since its aetiological agent is highly contagious. *Moraxella bovis* is considered mainly causative agent of infection, however *M. ovis* and *M. bovoculi* have also been recovered from animals with the disease. IK is documented to be a carrier disease, and these animals play a key role in maintaining the microorganism in a herd. However, it is still unclear which factors are related to the ability of *Moraxella* spp. survive in the conjunctiva and nasal mucosa of animals without promoting disease, as well as remain viable even after treatment with high antimicrobial dosages. In the current study, biofilm formation in *M. bovis*, *M. ovis* and *M. bovoculi* was considered as a factor associated with this maintenance of animals in the form of a carrier. In addition, the resistance capacity of *Moraxella* spp. to lysozyme, an important antibacterial enzyme present in the tear and acts as the first line of defense the invasion of the cornea by microorganisms. The resistance of microorganisms to lysozyme is associated with the ability to adhere to the cornea and to promote infection. In this research, it was evidenced that all the isolates of *M. bovis* (15/54), *M. ovis* (21/54) and *M. bovoculi* (18/54) tested (54/54) were able to form biofilm and were classified according to the intensity of biofilm formation. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of lysozyme were determined for 33 isolates of the three *Moraxella* species in planktonic cells. It was verified that MIC and MBC were quite variable intraspecies, of 79.12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ to values higher than 1266 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and there was no statistical difference in susceptibility to lysozyme among *Moraxella* spp. However, when tested in sessile forms, lysozyme did not have the capacity to eradicate the biofilms, but it promoted a reduction in the biofilms production. In addition, it was observed that in the consolidated biofilms there was no decrease after the addition of lysozyme, demonstrating that there is no action of this enzyme in previously established biofilms. The results of this research allow us to infer that the biofilm formation capacity of *M. bovis*, *M. ovis* and *M. bovoculi* and the resistance to lysozyme concentrations, equal to or greater than the physiological levels of the tear of cattle and sheep, may be linked not only to the ability to colonize the conjunctiva, but also the microorganism can remain at this site even after healing of the lesions and the infected animal will be considered a carrier and a reservoir of the etiologic agent of the disease in a herd.

Keywords: Infectious keratoconjunctivitis; Innate response; Bacterium; *Moraxella* spp.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Ceratoconjuntivite Infecciosa.....	10
2.2 <i>Moraxella</i> spp.....	13
2.3 Biofilmes bacterianos	14
2.4 Atividade antimicrobiana de lisozima.....	16
3. MANUSCRITO	18
Abstract	19
Introduction	20
Materials and methods	21
Results	24
Discussion	25
References	29
4. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXO A	43

1. INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite infecciosa (CI), também denominada *pinkeye*, é considerada a doença ocular de maior importância na criação de ruminantes em todo o mundo (ALEXANDER, 2010). Embora raramente fatal, resulta em perdas econômicas significativas para os rebanhos bovinos e ovinos (POSTMA; CARFAGINNI; MINATEL, 2008).

Os principais agentes envolvidos na ocorrência dessa enfermidade são as bactérias Gram negativas: *Moraxella bovis* (*M. bovis*), *Moraxella ovis* (*M. ovis*) e *Moraxella bovoculi* (*M. bovoculi*). Sendo que *M. bovoculi* foi descrito por Angelos et al. (2007). Este agente tem sido isolado de casos clínicos de CI e mesmo que diversos estudos tenham sido realizados tendo como foco este micro-organismo, poucos envolvem o potencial patogênico da bactéria em infecções naturais (O'CONNOR et al., 2012).

Nos episódios de infecção natural em bovinos as espécies mais comumente isoladas são *M. bovis* e *M. bovoculi*. Em ovinos, o isolamento de *M. ovis* é relatado como de maior ocorrência, entretanto, foi evidenciado também a presença de *M. bovis* em número menor de casos (LIBARDONI et al., 2012).

CI é considerada como sendo uma doença de portador, uma vez que *M. bovis* foi isolada de mucosa nasal e conjuntiva de bovinos sem sinal clínico ou histórico da enfermidade, bem como de animais com a doença clínica. Estes fatos demonstram que os animais infectados podem permanecer como um reservatório da enfermidade nos rebanhos (PUGH; MCDONALD, 1986).

Um aspecto da infecção que pode estar contribuindo para a persistência e a dificuldade de erradicação de *M. bovis* dos animais portadores é a possibilidade do micro-organismo possuir a capacidade de crescimento em forma de biofilme tanto na superfície córnea como na cavidade nasal dos hospedeiros (PRIETO et al., 2013). Os biofilmes representam um estado de existência bacteriana que fornece proteção contra as agressões ambientais e confere aos agentes patogênicos vantagens ligadas à virulência, resistência às defesas do hospedeiro e aos compostos antimicrobianos (O'TOOLE et al., 1999; O'TOOLE; KOLTER, 1998).

A capacidade de formação de biofilmes está ligada às condições ambientais adequadas, sendo que todos os micro-organismos, em condições ideais, apresentam potencial para estabelecer biofilmes (LASA et al., 2005). A formação destas comunidades sesséis e a sua resistência inerente aos agentes antimicrobianos estão relacionadas à origem de muitas infecções bacterianas persistentes e crônicas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999) e podem ainda facilitar a manutenção de uma doença em um rebanho através da existência de animais portadores.

A lisozima é uma enzima com atividade antibacteriana presente em tecidos e praticamente em todos os fluidos corpóreos. A atividade da lisozima é um dos principais mecanismos de defesa inata encontrado na lágrima bovina e ovina (GIONFRIDDO et al., 2000). Bactérias que apresentam resistência à lisozima possuem uma maior capacidade de permanecer viáveis na superfície córnea de alguns animais, mesmo sem apresentar a manifestação clínica da doença (WARREN et al., 2015). Indivíduos que apresentam essa infecção subclínica constituem os portadores e são importantes reservatórios de micro-organismos patogênicos em um rebanho, facilitando a ocorrência de enfermidades relacionadas à presença dos agentes microbianos.

Deste modo, objetivou-se, neste trabalho, demonstrar a capacidade de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* produzirem biofilmes, uma vez que estes estão diretamente envolvidos na persistência das infecções, resistência aos tratamentos com antimicrobianos e na persistência do agente nos rebanhos, principalmente em animais no estado de portador. Além disso, como o principal local de penetração de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* é pela via ocular e, ao mesmo tempo, ruminantes de diferentes espécies produzem lágrimas com composição variável, principalmente com níveis distintos de lisozima, podendo assim inibir ou não a adesão de *Moraxella* spp. na córnea. A lisozima, sendo um dos principais mecanismos de defesa antibacteriano local, apresentou atividade antibacteriana, quando testado frente a isolados de *Listeria monocytogenes* isolados de olhos bovinos (WARREN et al., 2015). Em virtude dessa capacidade antibacteriana desta enzima, o desenvolvimento de estudos envolvendo bactérias do gênero *Moraxella*, principal patógeno ocular de ruminantes, apresentam grande importância para avaliar a capacidade inibitória que a lisozima possui frente as espécies de *Moraxella* envolvidas em casos de CI. A realização deste estudo resultou em um manuscrito submetido para publicação e que está apresentado nesta dissertação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ceratoconjuntivite Infecciosa

A ceratoconjuntivite infecciosa (CI) é uma doença infectocontagiosa considerada a mais importante doença ocular de rebanhos bovinos e ovinos em todo o mundo (POSTMA; CARFAGINNI; MINATEL, 2008). Dentre as características da infecção, destaca-se a alta morbidade e sua apresentação clínica, que ocorre geralmente na forma de surtos, podendo acometer até 80% dos animais susceptíveis num período de três a quatro semanas (POSTMA; CARFAGINNI; MINATEL, 2008).

Bactérias do gênero *Moraxella* são os principais micro-organismos envolvidos na ocorrência de CI. *M. bovis* é o agente primário envolvido na doença em bovinos, embora *M. ovis* e *M. bovoculi* estejam frequentemente associadas aos casos clínicos (ALEXANDER, 2010; ANGELOS, 2010; LIBARDONI et al., 2012).

A CI quando acomete ovinos é denominada oftalmia contagiosa (OC) e está relacionada principalmente com alta densidade populacional, falhas no manejo sanitário e situações que cursem com a queda da imunidade. A etiologia primária está atribuída aos agentes bacterianos *Mycoplasma conjunctivae* e *Chlamydia psittaci*. Contudo, *M. ovis*, é oportunista e desempenha um papel secundário na enfermidade, contribuindo no agravamento dos sinais clínicos (DAGNALL, 1994). O isolamento de *M. bovis* também foi descrito em lesões oculares nesta espécie, porém com menor ocorrência (LIBARDONI et al., 2012).

A manifestação clínica da CI se dá pela presença de lacrimejamento, blefarospasmo, fotofobia, edema corneal e dor local. Caso não seja estabelecido um tratamento eficaz, pode ocorrer agravamento do caso, progredindo para ulceração corneal e demais camadas contíguas (ALEXANDER, 2010; O'CONNOR et al., 2012). Alguns casos de CI apresentam resolução espontânea. Entretanto, na maioria dos animais acometidos, se não for estabelecido um tratamento, há a ocorrência de graves danos à córnea, levando a ulceração profunda e prolapso da parte anterior câmara e conseqüente quadro irreversível de tiflose (ALEXANDER, 2010). Não é incomum observar em animais no campo a extensão da lesão envolvendo toda a córnea, com ruptura da membrana de Descemet e outras sequelas que resultam em excisão do globo ocular (CHANDLER;

SMITH; TURFREY, 1981). Animais que se recuperam da infecção podem apresentar cicatrizes permanentes na córnea e perda da visão (O'CONNOR et al., 2012).

A CI é uma doença altamente contagiosa, transmitida por contato direto, descarga nasal ou ocular de animais infectados e, principalmente por fômites e vetores mecânicos, como pastagens altas contaminadas e moscas que atuam carreando o agente para animais susceptíveis (WEBBER; SELBY, 1981). Na maioria dos rebanhos, há ainda a presença de animais portadores de *Moraxella* spp., os quais são fonte de infecção e reservatórios do agente (PUGH; HUGHES, 1975). A doença pode se manifestar em qualquer época do ano, todavia há um acréscimo no número de casos de CI na primavera, sendo que o ápice dos surtos ocorre no verão. A expressão sazonal da CI é fortemente associada aos componentes que participam da cadeia de transmissão da doença, por exemplo, ao aumento da população de moscas e ao ciclo de vida da mosca da face (*Musca autumnalis*), que constitui um importante vetor para *Moraxella* spp. (PUGH; HUGHES, 1975; SNOWDER et al., 2005).

A colonização da córnea de animais por *M. bovis* e *M. bovoculi* foi observada em animais aparentemente saudáveis, uma vez que esses micro-organismos foram cultivados a partir de amostras de olhos de bovinos sem sinais clínicos (ANGELOS, 2015). Exatamente quais fatores intrínsecos estão envolvidos nessa variação de *Moraxella* spp. comensal para ocasionar doenças ainda não foi bem esclarecido. No entanto, é preciso considerar também os fatores extrínsecos envolvidos no desenvolvimento de um surto de CI (ANGELOS, 2015).

Animais de todas as idades podem ser afetados por CI, no entanto, a maioria dos casos ocorre em animais jovens, frequentemente entre 2 e 12 meses de idade. Bovinos dessa faixa etária usualmente apresentam as lesões mais graves (FUNK et al., 2014; PUGH; MCDONALD, 1986; WEBBER; SELBY, 1981). Além disso, parece existir uma predisposição racial na ocorrência de CI. Snowden et al. (2005) evidenciaram que em bovinos, animais da raça Hereford foram mais afetados em comparação com animais de outras raças europeias (*Bos taurus*), zebuínos (*Bos indicus*) e cruzamentos. Onde 22,4% dos animais da raça Hereford avaliados apresentaram a doença, representando mais de três vezes a média geral, que foi de 6,5%. As demais raças com maior incidência foram Simental (7,6%) e Charolês (6,5%), também raças europeias. Em animais *Bos indicus*, os níveis de ocorrência de CI são considerados pouco relevantes, devido à sua baixa manifestação nesses rebanhos. Outra característica que

parece ser relacionada a maior ocorrência da CI é a pigmentação da margem do olho. Os motivos da diminuição da ocorrência e gravidade da infecção com aumento do grau de pigmentação podem estar relacionados ao efeito deletério da luz ultravioleta (FRISCH, 1975). Hughes, Pugh e McDonald (1965) relataram que a luz ultravioleta aumentou o desenvolvimento de CI artificialmente induzida e concluiu que essa radiação pode desempenhar um papel importante na etiologia da doença.

Snowder et al. (2005) também demonstraram que o peso de desmame foi significativamente reduzido pela ocorrência de CI. O peso de desmame dos bezerros diagnosticados com CI foi reduzido em 8,9 kg em comparação com os bezerros saudáveis. Essa variação de peso entre animais acometidos por CI em relação a animais do mesmo lote sem apresentação clínica pode ser ainda mais evidente, como demonstrado por Frisch (1975), onde a redução média de peso em animais aos 15 meses observada foi de 22,8 kg. Animais acometidos por CI podem apresentar relutância em competir por comida ou posição, geralmente em relação direta com a gravidade da infecção (PUGH; HUGHES, 1970). Essa redução na ingestão de alimentos por animais com quadro de CI explicaria a relação entre gravidade da infecção e peso. Em estudo conduzido por Funk et al. (2014), evidenciou-se que bezerros com evidência de CI, como a cicatrização da córnea, por exemplo, continuarão a pesar menos que bezerros não afetados mesmo após longo período. Estes dados demonstram claramente o prejuízo econômico da CI à produção pecuária.

As medidas preventivas e terapêuticas disponíveis para controlar a CI têm apresentado sucesso limitado (CONCEIÇÃO; GIL TURNES, 2003). O tratamento pode ser realizado por aplicação de drogas com atividade antimicrobiana por via sistêmica, tópica ou subconjuntival, dependendo da droga a ser utilizada (ANGELOS et al., 2000; GEORGE; SMITH, 1985). Foi descrita a resistência de isolados de *Moraxella* spp. frente aos antimicrobianos tradicionalmente usados para o tratamento de CI, principalmente à penicilina G, oxitretaciclina e florfenicol (ANGELOS; BALL; BYRNE, 2011; MABONI et al., 2015).

Muitas vacinas comerciais disponíveis atualmente contêm diferentes cepas de *M. bovis*, possivelmente em decorrência de apenas essa espécie ser reconhecida como agente etiológico responsável pelo desenvolvimento de lesões primárias de CI. Esse pode ser um dos motivos pelo qual estudos tem demonstrado proteção apenas parcial dessas vacinas e a efetividade dessas vacinas no controle desta enfermidade é

questionável (BURNS; O'CONNOR, 2008; O'CONNOR et al., 2011; SOSA; ZUNINO, 2013).

2.2 *Moraxella* spp.

O gênero *Moraxella* engloba bactérias Gram negativas, aeróbias, pertencentes à família *Moraxellaceae*, compreendida na classe das Proteobacterias (ROSSAU et al., 1991). Vinte e duas espécies estão descritas neste gênero, entre as quais algumas são consideradas comensais de mucosas de animais e humanos (LOY; BRODERSEN, 2014).

A morfologia apresenta-se desde cocos aos pares, como em *M. ovis* e *M. bovoculi*, até a forma cocobacilar ou de bacilos curtos em cadeia, como em *M. bovis*. Estes microorganismos são imóveis, oxidase positiva, variável para catalase e colagenase, não formadores de esporos, não fermentadores de carboidratos e não redutores de nitratos (ANGELOS, 2010; LIBARDONI et al., 2012; QUINN et al., 2005).

Cepas patogênicas, normalmente são hemolíticas e apresentam como fator primário de patogenicidade a expressão de fímbrias (pili tipo IV), que são proteínas de superfície responsáveis pela aderência da bactéria aos receptores específicos das células epiteliais da córnea e conjuntiva do hospedeiro. Também são fundamentais para a adesão em superfícies em geral, contribuindo assim para a formação de agregados celulares (GIL TURNES, 1983).

Este agente bacteriano também secreta citotoxinas corneotóxicas, além de produzir fosfolipases e enzimas proteolíticas e hidrolíticas. Estes fatores, juntamente com a presença de fímbrias, são responsáveis pela adesão da célula bacteriana à mucosa ocular e pelo estabelecimento da doença clínica (POSTMA; CARFAGINNI; MINATEL, 2008; PUGH; HUGHES, 1968, 1970).

Ruehl et al. (1988) demonstraram que a presença de pili tipo IV é de fundamental importância para a aderência microbiana aos receptores no epitélio da córnea durante o estabelecimento de uma nova infecção. Adicionalmente, este fator de virulência parece participar na formação e estabilidade de biofilmes, na competência para transformação

genética e no movimento independente de flagelo, denominado *twitching motility* (KODJO; EXBRAYAT; RICHARD, 1994; PRIETO et al., 2013).

A presença de fimbrias está associada a presença de colônias rugosas que auto-aglutinam em água destilada e, também, aglutinam hemácias. Estas colônias ao serem removidas do ágar, deixam pequenas concavidades no meio de cultivo, fenômeno conhecido por corrosão do ágar. Algumas cepas não hemolíticas são frequentemente isoladas de bovinos e, geralmente, não estão associadas com relatos de doença clínica em rebanhos (BROWN et al., 1998).

2.3 Biofilmes bacterianos

A formação de biofilmes representam um dos mais importantes mecanismos de colonização e fixação de micro-organismos na natureza (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Em definição geral, os biofilmes são comunidades de micro-organismos, envoltas por uma matriz extracelular, ligadas às superfícies bióticas ou abióticas, o que geralmente leva ao aumento da resistência aos agentes antimicrobianos (HOIBY et al., 2010).

Richards e Melander (2009) relataram que cerca de 75% das infecções crônicas em humanos são determinadas pela formação de biofilmes bacterianos. Alguns autores sugerem que grande parte das infecções com formação de biofilmes em humanos são de origem zoonótica (PERCIVAL; GARCIA, 2011); deste modo, ressalta a importância da presença de infecções por micro-organismos formadores de biofilmes em medicina veterinária.

O processo de adesão bacteriana ocorre a partir de polímeros de exopolissacarídeo, os quais se ligam a uma superfície e as células oriundas da divisão bacteriana se unem a esse polímero, formando os agregados bacterianos (COSTERTON et al., 1987). Os polissacarídeos são os principais componentes da matriz polimérica extracelular, contudo outros constituintes fazem parte de sua composição, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Estudos comprovam que, em alguns micro-organismos, proteínas de superfície exercem papel importante na formação de biofilmes (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007). Dentro do biofilme existe ainda um processo de

sinalização célula-célula, conhecido como *quorum sensing* (QS), que envolve a produção e detecção de moléculas sinalizadoras extracelulares chamadas autoindutores (CHEN; WEN, 2011). A formação de biofilmes começa com a adesão da célula planctônica à superfície. Após a adesão primária, o processo de adesão é consolidado através da produção de exopolissacarídeo, que se complexam à superfície e aos receptores específicos localizados nos flagelos ou pili. Após este processo, inicia-se, então, a formação de micro colônias e a maturação do biofilme. Quando o biofilme atinge o equilíbrio dinâmico, ocorre a ruptura e a liberação de células das camadas mais externas, que em estado livre podem colonizar novas superfícies (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007).

Estudos demonstraram que bactérias em biofilmes estão relacionados com a cronicidade das infecções por promoverem um aumento significativo da resistência aos antibióticos e aos mecanismos de defesa do sistema imune quando comparados às bactérias que crescem apenas em suspensão (planctônicas) (GRESSLER et al., 2015; TIBA; NOGUEIRA; LEITE, 2009; VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007). Esse aumento na resistência aos antibióticos de bactérias em biofilmes pode ser observado na variação entre a concentração inibitória mínima (CIM) de culturas bacterianas planctônicas e a concentração do agente antimicrobiano necessária para erradicar micro-organismos em biofilme (OLSON et al., 2002).

Além de estimular a produção de colônias mais resistentes, a ineficácia da resposta imune frente ao biofilme bacteriano pode causar dano tecidual, uma vez que os fagócitos que são atraídos para o local não conseguem fagocitar as células bacterianas em biofilme, eles ainda liberam enzimas fagocíticas que danificam o tecido ao redor do biofilme (CLUTTERBUCK et al., 2007).

Logo, a formação de biofilme por patógenos humanos foi bem estabelecida. No entanto, estudos têm demonstrado também em micro-organismos de origem animal essa capacidade de se organizar na forma de comunidades (DIAS et al., 2017; GRESSLER et al., 2015; KAMARUZZAMAN et al., 2017; TASSEW et al., 2017; VERGARA et al., 2017).

Embora existam evidências crescentes de que os biofilmes bacterianos participem de uma variedade de infecções oculares por formação direta de biofilme nas superfícies do olho, ainda são insuficientes os estudos envolvendo a participação de biofilmes na

ocorrência de CI. A capacidade de isolados clínicos de *M. bovis* e cepa de referência em formar biofilmes foi avaliada por Prieto et al. (2013), porém o número de isolados utilizado foi limitado .

Prieto et al. (2013) demonstraram que *M. bovis* na forma de biofilme apresentou concentração bactericida mínima (CBM) frente aos antibióticos testados até 1000 vezes superior quando comparada a CBM para células planctônicas. Esse resultado pode explicar parcialmente as dificuldades encontradas no estabelecimento de um protocolo baseado em antimicrobianoterapia que se mostre efetivo na eliminação de recidivas e do estado de portador na CI (MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007).

2.4 Atividade antimicrobiana de lisozima

A lisozima foi inicialmente descrita por Fleming (1922) como um "elemento bacteriolítico notável", após observar atividade de uma gota de muco sobre bactérias em ágar. As lisozimas são enzimas que hidrolisam o polímero de peptidoglicano (PG) da parede celular bacteriana. O PG é componente estrutural da parede celular bacteriana, cuja função principal é fornecer resistência contra a pressão do turgor, sendo que a sua clivagem resulta em bacteriólise (RAGLAND; CRISS, 2017). Apresenta resultado principalmente na destruição de Gram-positivas. Em Gram-negativas, é geralmente associada com outras substâncias, como a lactoferrina, para aumentar a atividade antimicrobiana (ELLISON; GIEHL, 1991).

A lisozima é uma enzima antibacteriana presente nos tecidos e praticamente em todos os fluidos corpóreos. Nos mamíferos, a lisozima é encontrada em abundância no sangue, em secreções, incluindo lágrimas, urina, saliva e leite, nas superfícies mucosas e em fagócitos (RAGLAND; CRISS, 2017).

A lisozima é considerada um dos principais mecanismos de defesa inata encontrado na lágrima bovina e ovina (GIONFRIDDO et al., 2000), atuando como uma primeira linha de defesa contra a colonização ou infecção bacteriana.

Gionfriddo et al. (2000) sugeriram que a diferença de susceptibilidade de lhamas e bovinos à CI pode estar relacionada aos diferentes constituintes da lágrima em cada uma das espécies, o que implicaria em uma certa resistência a infecções oculares por lhamas.

Não há estudos demonstrando a atividade de lisozima contra a adesão e invasão à superfície da córnea por *Moraxella* spp. Entretanto, Warren et al. (2015) demonstraram a atividade da lisozima frente aos isolados de *Listeria monocytogenes* oriundos de olhos bovinos. Este fato indica que a capacidade de uma bactéria infectar a conjuntiva bovina pode estar associada com a sua resistência à lisozima.

Além da conhecida atividade antimicrobiana da lisozima, há abordagens utilizando essa enzima para estabilizar lipossomas e possibilitar a ação dessas moléculas associados a antibióticos sobre biofilmes. Hou et al. (2017) demonstraram que a utilização de gentamicina lipossomal associada à lisozima (LLG) foi mais eficaz para cessar os biofilmes consolidados, tanto de bactérias patogênicas Gram-positivas como Gram-negativas, do que apenas a gentamicina. Adicionalmente, LLG demonstrou evitar que as células bacterianas planctônicas conseguissem estabelecer-se na forma de biofilmes. Esta estratégia pode ser útil no desenvolvimento de novas tratamentos para infecções crônicas e recorrentes relacionadas aos biofilmes.

3. MANUSCRITO

***Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi*: Biofilm formation and lysozyme activity**

Valessa L. Ely^a, Agueda C. Vargas^a, Mateus M. Costa^b, Helinando P. Oliveira^b, Luciana Pötter^c, Magdiel A. Reghelin^a, Antônio W. Fernandes^b, Daniela I. B. Pereira^d, Luís A. Sangioni^a, Sônia A. Botton^{a*}

(Artigo submetido para publicação – Journal of Applied Microbiology - ANEXO - A)

^a Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Prédio 44, Sala 5125. Santa Maria, Brazil. CEP 97105-900. *Corresponding author: Tel.: +55 55 3220 8107. E-mail adress: sabott20@gmail.com

^b Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rodovia BR 407 - Km 12, Lote 543, Projeto Irrigação Senador Nilo Coelho s/nº, Petrolina, Brazil. CEP 56300-990.

^c Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, Brazil. CEP 97105-900.

^d Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº, Brazil. CEP 96160-000.

1 ***Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi*: Biofilm formation and lysozyme**
2 **activity**

3 Valessa L. Ely^a, Agueda C. Vargas^a, Mateus M. Costa^b, Helinando P. Oliveira^b, Luciana Pötter^c,
4 Magdiel A.Reghelin^a, Antônio W. Fernandes^b, Daniela I. B. Pereira^d, Luís A. Sangioni^a, Sônia A.
5 Botton^{a*}

6
7 **Abstract**

8 Infectious keratoconjunctivitis (IK) is the main ocular disease in ruminants and causes large
9 production losses worldwide. *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi* are the main
10 agents isolated from the animals affected by IK. This study aimed to verify the formation of
11 biofilms by *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi* isolates from ruminants (n = 54). In addition,
12 the lysozyme activity against the isolates of *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi* in free form
13 (planktonic) and in biofilms was determined. In this research, it was possible to demonstrate, for the
14 first time, the ability to form biofilms by *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi*. The isolates of *Mor. bovis*,
15 *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi* have the capacity to form biofilms in different intensities, varying
16 among weak, moderate and strong biofilm producers. In relation to the susceptibility of *Moraxella*
17 spp. isolates against lysozyme, it was verified that this enzyme shows activity on this
18 microorganism in planktonic form. However, in biofilms there was a reduction in the production,
19 but without impairing its formation, and in consolidated biofilms it did not have the capacity to
20 eradicate the preformed biofilms.

21 **Keywords:** Biofilm; susceptibility; Lysozyme; *Moraxella* spp.; Minimal inhibitory concentration

23 **Introduction**

24 *Moraxella bovis* (*Mor. bovis*), *Moraxella ovis* (*Mor. ovis*) and *Moraxella bovoculi* (*Mor.*
25 *bovoculi*) are the main bacterial agents isolated from animals with clinical manifestations of
26 infectious keratoconjunctivitis (IK) (Angelos et al., 2007; Postma et al., 2008). IK is the most
27 important ocular disease in ruminant farms worldwide, although it is rarely fatal it causes
28 significant economic losses in the herds affected due to the lesions caused and the costs of treatment
29 (Postma et al., 2008).

30 Biofilms are communities of microorganisms surrounded by an extracellular matrix that
31 adhere to biotic or abiotic surfaces (Holby et al., 2010). Biofilms probably represent one of the most
32 important mechanisms of colonization and fixation by microorganisms in nature (Costerton et al.,
33 1999). Studies have shown that biofilms are related to the chronicity of infections since they are
34 able to promote a significant increase in antimicrobial resistance and defense mechanisms of the
35 immune system compared to bacteria that grow only in planktonic form (Tiba et al., 2009; Gressler
36 et al., 2015). However, studies involving biofilms in the microorganisms of veterinary interest are
37 still scarce, including *Moraxella* genus. Consequently, more knowledge about biofilms is necessary
38 in order to understand the capacity of infection as well as the maintenance of bacteria in the host.

39 Lysozyme is one of the main innate defense mechanisms found in bovine and ovine tears
40 (Gionfriddo et al., 2000). Warren et al. (2015) demonstrated the activity of lysozyme against the
41 isolates of *Listeria monocytogenes* from bovine corneas, indicating that the ability of a bacterium to
42 infect the bovine conjunctiva may be associated with the bacterium's resistance to lysozyme. In this
43 sense, *Moraxella* genus is also able to penetrate and promote adhesion to the surface of the cornea
44 and lysozyme is one of the main factors of innate defense present in the tear, thus studies
45 demonstrating the activity of this enzyme in the clinical isolates of *Moraxella* spp. are important
46 and necessary.

47 Taking into account what was stated previously, the aim of this study was to determine the
48 capacity of biofilm formation in the different species of *Moraxella* of veterinary interest and to

49 evaluate the susceptibility of *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi* in the planktonic and sessile
50 forms against lysozyme.

51

52 **Materials and methods**

53 ***Moraxella* spp. isolates**

54 In this study, the clinical isolates of *Moraxella* spp. obtained from bovine and ovine clinical
55 samples from Rio Grande do Sul State in South of Brazil, Argentina and Uruguay were used. All of
56 the isolates were characterized by molecular and morphological analyses, based on previous
57 research (Angelos et al., 2007; Libardoni et al., 2012). Fifty-one clinical isolates were identified as
58 *Mor. bovis* (n = 14), *Mor. ovis* (n = 20) and *Mor. bovoculi* (n = 17). In addition, the following
59 standard strains: ATCC 10900 (*Mor. bovis*), ATCC 19575 (*Mor. ovis*) and ATCC BAA1259 (*Mor.*
60 *bovoculi*) were employed in the corresponding assays.

61 **Biofilm production by *Moraxella* spp.**

62 The clinical isolates previously characterized as *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi*
63 and the three standard strains were used to test the capacity of biofilm formation (n = 54). This test
64 was based on the protocol described by Stepanovic et al. (2007) with modifications. The isolates of
65 *Moraxella* spp. were incubated at 37°C for 24 hours in Tryptone Soya Broth (TSB) (Himedia®
66 Laboratories) enriched with 1% glucose. Subsequently, a volume of 200 µl (~ 2x 10⁸ CFU ml⁻¹) was
67 transferred to polystyrene microplates and incubated at 37°C for 48 hours for the growth and
68 adherence of bacterial cells. The non-adhered cells were removed with three successive washes with
69 sterile distilled water (200 µl). A solution of 0.25% gentian violet (100 µl) was added to each well
70 of the plate and three washes were performed with sterile distilled water (200 µl). Next, the plate
71 was dried at room temperature. The adhered bacteria were resuspended in 80:20 alcohol-acetone to
72 perform optical density spectrophotometer reading (OD₅₅₀) (Thermo Scientific®). As positive
73 control of the test was used the standard strain of *Staphylococcus aureus* ATCC27923 (Marques et

74 al., 2007) and TSB with 1% sterile glucose was used for negative control. All of the tests were
75 performed in triplicate.

76 The classification of the isolates for biofilm production was carried out by means of a
77 comparison between OD₅₅₀ of the negative control (OD_N) and *Moraxella* isolates (OD_{MI}). All of
78 optical densities were calculated as the arithmetic mean of the triplicates. The isolates were
79 classified as weak (OD_N < OD_{MI} < 2.OD_N), moderate (2.OD_N ≤ OD_{MI} ≤ 4.OD_N) or strong (4.OD_N
80 < OD_{MI}) biofilm forming agents (Stepanovic et al., 2007).

81 ***In vitro* susceptibility of the planktonic cells of *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi* to** 82 **lysozyme**

83 *In vitro* susceptibility test to lysozyme was determined for 33 isolates of *Mor. bovis* (n = 10),
84 *Mor. ovis* (n = 11) and *Mor. bovoculi* (n = 12) using the broth microdilution method in 96-well
85 microplates, based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) with adaptations.
86 The microorganisms were cultured in 5% sheep blood agar for bacteriological growth at 37°C for
87 24 hours. A bacterial colony was transferred to Brain Heart Infusion (BHI) broth (Himedia®
88 Laboratories) and homogenized. From the inoculated BHI broth, a 10 µl aliquot (~ 1x10⁴ CFU ml⁻¹)
89 was transferred to each well tested. The same procedure was performed for the positive control. The
90 concentrations of lysozyme (egg white lysozyme, Ludwig Biotec®) evaluated ranged from 79.12 to
91 1266 µg ml⁻¹. The minimum inhibitory concentration (MIC) value was defined as the lowest
92 concentration of lysozyme capable of inhibiting the visible development of the microorganism on
93 the microplate, with 30 µl of 0.02% resazurin (Sigma®) used as developer. The minimum bacterial
94 concentration (MBC) value was defined as the lowest concentration of lysozyme in which bacterial
95 growth was not evidenced after plating on BHI agar (Himedia® Laboratories), incubated at 37°C
96 for 48 hours. All of the tests were performed in triplicate.

97 **Effect of lysozyme on forming biofilms and consolidated biofilms**

98 In this experiment, all of the tests were performed on 96-well sterile polystyrene microplates
99 and in triplicate. Thirty *Moraxella* spp. isolates able to form biofilm were selected, including *Mor.*
100 *bovis* (n = 9), *Mor. ovis* (n = 8) and *Mor. bovoculi* (n = 13). These isolates were used to verify the
101 activity of lysozyme on biofilms in formation and consolidated.

102 To determine the activity of lysozyme in the formation of biofilms, 100 μ l of TSB plus 1%
103 glucose, previously inoculated with each of the bacterium under test ($\sim 2 \times 10^8$ CFU ml⁻¹) and 100 μ l
104 of lysozyme were added. Therefore, the final concentration of the lysozyme in each test well was
105 equal to the MIC previously measured. Then, the microplates were incubated for 48 hours and the
106 other procedures were identical to those described to test the capacity of biofilm formation by
107 *Moraxella* spp.

108 To verify the ability to eradicate consolidated biofilms, the protocol previously described by
109 Nostro et al. (2007) was used with adaptations. After 48 hours of incubation at 37°C, the microplate
110 containing the biofilm formed for each isolate tested was washed with sterile distilled water (200
111 μ l) for the removal of the planktonic bacterial cells. Afterwards, 200 μ l of previously established
112 lysozyme MIC was added and reading OD₅₅₀ (OD_{0h}). Again, the plates were incubated at 37°C for
113 24 hours and the final reading (OD_{24h}) was performed for the comparison of OD.

114 **Scanning electron microscopy (SEM)**

115 The preparation of the material for scanning electron microscopy (SEM) was performed
116 according to the method described by Freitas et al. (2010). In this assay, three standard strains of
117 each species of *Moraxella* and a clinical isolate of *Mor. bovoculi* classified as biofilm-forming were
118 tested. The microorganisms were incubated in TSB with 1% glucose for 48 hours at 37°C for
119 biofilm formation. Thereafter, a 10 μ l aliquot was removed and transferred to slides covered with
120 copper tape. The slides were dried at room temperature and they were fixed in 1% glutaraldehyde
121 for a period of 2.5 hours. Later, the samples were dehydrated with ethanol in increasing
122 concentrations of 50%, 70%, 80%, 95%, and 100%, remaining 20 minutes immersed in each

123 alcohol concentration. Next, the samples were re-immersed in 100% acetone for 5 minutes and
124 dried at room temperature. Finally, *Moraxella* spp. isolates were submitted to metallization by a
125 gold bath (Quorum®). The slides were visualized under an electron microscope (Tescan®).

126 **Statistical analysis**

127 All of the data were submitted to normality tests. Due to the lack of normality, data on
128 biofilm formation capacity and MIC values for *Moraxella* species were evaluated by the Kruskal-
129 Wallis test. The analyses were carried out with the statistical program SAS, version 9.2 (SAS 2009).

130 **Results**

131 All of the isolates of *Moraxella* spp. evaluated in this study (100%, 54/54) demonstrated the
132 ability to form biofilm. The classification of biofilm production showed that the three species of
133 *Moraxella* tested presented weak, moderate and strong capacity for biofilm formation (Table 1).
134 However, statistical analysis showed no difference ($p > 0.05$) in the capacity and intensity of biofilm
135 formation among the evaluated species.

136 The results MIC and MBC of *Moraxella* spp. isolates against lysozyme are shown in Table
137 2. Statistically, there was no difference in the MIC values among *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor.*
138 *bovoculi* ($p > 0.05$). The MIC of the lysozyme against *Moraxella* spp. evaluated showed
139 concentrations ranging from $79.12 \mu\text{g ml}^{-1}$ to values higher than $1266 \mu\text{g ml}^{-1}$. The values for *Mor.*
140 *bovis* isolates ranged from $158.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ to $1266 \mu\text{g ml}^{-1}$, *Mor. ovis* of $316.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ to
141 concentrations $> 1266 \mu\text{g ml}^{-1}$ and *Mor. bovoculi* of $79.12 \mu\text{g ml}^{-1}$ up to $1266 \mu\text{g ml}^{-1}$.

142 In this study, the MBC values of lysozyme to *Moraxella* spp. isolates obtained were $633 \mu\text{g}$
143 ml^{-1} at concentrations higher than $1266 \mu\text{g ml}^{-1}$. In all *Mor. ovis* isolates (100%, 11/11), growth was
144 observed at the highest concentration of lysozyme tested ($> 1266 \mu\text{g ml}^{-1}$). However, for the isolates
145 of *Mor. bovoculi*, lysozyme presented bactericidal activity in 25% (3/12) at the concentration of 633
146 $\mu\text{g ml}^{-1}$, in 8.3% (1/12) at $1266 \mu\text{g ml}^{-1}$ and in 66.7% (8/12) showed no bactericidal activity up to
147 the highest concentration tested ($> 1266 \mu\text{g ml}^{-1}$). For *Mor. bovis*, only one isolate (10%, 1/10)

148 showed no growth at concentration of 1266 $\mu\text{g ml}^{-1}$. However, the other *Mor. bovis* isolates tested
149 (90%, 9/10) growth was observed until the highest concentration evaluated ($> 1266 \mu\text{g ml}^{-1}$).

150 In the lysozyme activity assays against the biofilms in formation of *Moraxella* spp., a
151 reduction of the biofilm production was observed in the three *Moraxella* species that were evaluated
152 when compared to the respective isolates under the same growth conditions without the addition of
153 lysozyme. Interestingly, *Moraxella* spp. previously classified as weak biofilm producers, after the
154 addition of lysozyme were not totally inhibited. However, isolates previously classified as moderate
155 and strong biofilm forming agents showed a reduction in the capacity of biofilms production and
156 they became weak or moderate biofilm producers (Table 3).

157 In this study, on the consolidated biofilms of *Moraxella* spp. isolates evaluated the lysozyme
158 was not able to destroy these biofilms.

159 In the scanning electron microscopy (SEM), it was possible to observe the formation and the
160 difference in biofilm production by *Moraxella* isolates evaluated, as shown in Figure 1. The
161 standard strains of *Mor. ovis* (ATCC 19575), *Mor. bovoculi* (ATCC BAA1259) and *Mor. bovis*
162 (ATCC 10900) demonstrated to be weak, moderate and strong biofilm producers, respectively. The
163 clinical isolate of *Mor. bovoculi* presented as a strong biofilm producer in the SEM. These results
164 are in agreement with what was previously demonstrated in the classification by the biofilm
165 formation test performed on microplates.

166 **Discussion**

167 All *Moraxella* isolates of veterinary importance, including *Mor. bovis*, *Mor. ovis*, and *Mor.*
168 *bovoculi*, presented the ability to form biofilms. In a previous study, Prieto et al. (2013) observed
169 biofilm formation in four *Mor. bovis* isolates. For the species *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi*, to date,
170 no study evaluating the ability to form biofilms has been described. Therefore, this is the first study
171 that has demonstrated the capacity of biofilm formation by these two species. Furthermore, it was
172 possible to evidence the biofilm production capacity of all 15 clinical isolates of *Mor. bovis*
173 included in the current study.

174 Richards and Melander (2009) reported that approximately 75% of human infections are
175 determined by the formation of bacterial biofilms. According to Jaques et al. (2010), bacteria in the
176 form of biofilm present greater resistance to the host immune response and are less susceptible to
177 antibiotics and disinfectants when confronted in planktonic presentation. In addition,
178 microorganisms released from biofilms participate in the spread of infectious agents to hosts and to
179 the environment (Kaplan, 2010). However, there are still rather few studies in veterinary medicine
180 involving the formation of biofilms by pathogenic microorganisms. Ferris et al. (2014) reported that
181 biofilms favor antimicrobial resistance and play an important role in virulence factors in animal
182 chronic bacterial infections, especially related to the reproductive tract of horses. Recently, our
183 research group demonstrated the formation of biofilms by *Rhodococcus equi* from clinical and non-
184 clinical samples of horses (Gressler et al., 2015). In addition, Peixoto et al. (2015) and Salimena et
185 al. (2016) investigated the formation of biofilms by *Staphylococcus* spp. isolated from cases of
186 bovine mastitis. However, studies involving the formation of biofilms by different species of
187 *Moraxella* are still scarce, and most of them are related to human infections by *Moraxella*
188 *catarrhalis* (Pearson et al., 2006). Perez et al. (2014) conducted an experimental study infecting
189 intranasally mice and chinchillas with *Mor. catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* showing
190 that polymicrobial biofilms significantly could influence the resistance to antimicrobial treatments
191 and bacterial persistence *in vivo*, especially in children otitis.

192 Problems in eradicating keratoconjunctivitis in bovine herds may be related to the
193 persistence of *Mor. bovis* in the field and the establishment of biofilms in the eyes and nasal cavity
194 of ruminants, as suggested by Prieto et al. (2013). *Mor. bovis* was isolated from both animal
195 categories with no clinical sign of disease and in clinically affected animals, indicating maintenance
196 capacity in the condition of *Moraxella* spp. carriers and thus constituting a reservoir of disease in
197 the herd (Pugh and McDonald, 1986). Considering the results found, it is possible to suggest that
198 this capacity of biofilm formation by *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi* may be linked not

199 only to the ability to colonize the conjunctiva but also to remain in this site even after lesions
200 healing, in a carrier condition and serving as reservoir of disease in a herd.

201 Lysozyme is one of the major antibacterial defense mechanisms present in the eye. In the
202 present work, susceptibility tests were performed to evaluate the antimicrobial effects of lysozyme
203 against *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi* isolates, which are causative agents of IK.
204 Gionfriddo et al. (2000) reported that the concentration of lysozyme found in the eye of cattle and
205 sheep is approximately 580 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 630 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The results of this research
206 showed that there was no variation in lysozyme sensitivity among the three *Moraxella* species.
207 However, it was noticed that for *Mor. ovis*, the concentrations of lysozyme needed to inhibit
208 bacterial multiplication were slightly higher than for the other species tested. Therefore, it is
209 suggested that the greater capacity of *Mor. ovis* to infect sheep when compared to the other
210 *Moraxella* species may be due to *Mor. ovis* lower susceptibility to lysozyme, since sheep have
211 higher concentrations of this enzyme in their tear than the bovine.

212 Warren et al. (2015) demonstrated lysozyme activity against *Listeria monocytogenes* isolates
213 from both sick and healthy animals. The authors evidenced higher levels of lysozyme resistance in
214 clinical isolates compared to the healthy eye isolate. For this isolate, the ability to remain viable in
215 the cornea was suggested, but without the ability to promote disease. This can be explained by the
216 fact that *in vitro* lysozyme MIC was lower than the levels of lysozyme found in tear *in vivo*. In
217 addition, MBC demonstrated that the levels of lysozyme required for the elimination of the
218 microorganism were higher than the physiological ones for the bovine species. Of the isolates of
219 *Moraxella* spp. tested, 63.6% (21/33) were inhibited by lysozyme at concentrations equal to or
220 lower than the physiological values present in ruminant tear. On the other hand, only in 9.1% (3/33)
221 of the isolates it was evidenced the bactericidal capacity of lysozyme in physiological
222 concentrations. However, for the majority of the isolates evaluated (90.9%, 30/33) there was no
223 microbial elimination by this enzyme.

224 In this study, the lysozyme, in the tested concentrations, not totally preventing the formation
225 of biofilms, but it promoted the reduction of the biofilm formation capacity compared to *Moraxella*
226 spp. isolates tested without addition of lysozyme, according to the data shown in Table 2.

227 The absence of action of lysozyme on consolidated biofilms from all of the isolates
228 evaluated can be explained by the protected state that bacterial cells are when in the biofilm forms.
229 Studies suggest that the biofilm resistance may be due to the impenetrability of the antimicrobial
230 agents made difficult by the existence of a polymer in the exopolysaccharide matrix that coats the
231 biofilm, as well as the strategies of the release of antimicrobial agents (Smith, 2005).

232 *L. monocytogenes* are naturally lysozyme-resistant microorganisms due to the presence of
233 genes that promote changes in the peptidoglycan structure and in the host immune response to the
234 agent (Burke et al., 2014). Thus, the high level of lysozyme resistance observed in many clinical
235 isolates may be associated to a selective advantage conferred by an ability to survive the challenge
236 of host lysozyme and to evade the host immune response (Warren et al., 2015). Due to absence of
237 studies involving the mechanism of lysozyme action in free cells and in biofilms of *Moraxella* spp.,
238 thus there is a need for research to better explain this process.

239 In the scanning electron microscopy (SEM), it was possible to confirm the biofilm
240 production by *Moraxella* spp., as well as the biofilm architecture of *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor.*
241 *bovoculi* could be visualized. In addition, by the SEM, it was evidenced the presence of bacterial
242 cells surrounded by an exopolysaccharide matrix. In the composition of biofilms demonstrated in
243 studies involving other microorganisms, including *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*, the
244 exopolysaccharide matrix is important because it promotes union and stability of bacterial cells
245 (Marques et al., 2007). Watnick and Kolter (1999) reported that the exopolysaccharide acts in the
246 stabilization of the three-dimensional structure of the biofilm, through mechanisms such as the
247 physical restraint and minimization of intercellular repulsions both by maintaining an intercellular
248 distance and by protecting against electrostatic charges on the bacterial surface.

249 Finally, this work shows the capacity of biofilm formation by *Moraxella* species of
250 veterinary importance. It is noteworthy that this is the first study to report the formation of biofilms
251 by *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi*. In addition, the isolates of *Mor. bovis*, *Mor. ovis* and *Mor. bovoculi*
252 range from weak, moderate and strong biofilm producers. The susceptibility of *Moraxella* spp. in
253 planktonic form against lysozyme demonstrates that this enzyme has bacteriostatic activity on this
254 microorganism. Additionally, the lysozyme reduced the production of biofilms, but did not inhibit
255 the biofilm formation by *Moraxella* spp. Moreover, the enzyme did not present the eradication
256 capacity of the consolidated biofilms.

257 **Conflict of interest**

258 The authors reported no potential conflict of interest.

259 **References**

- 260 Angelos, J.A., Spinks, P.Q., Ball, L.M. and George, L.W. (2007) *Moraxella bovoculi* sp. isolated
261 from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Int J Syst Evol Microbiol* 57,789–795.
- 262 Burke, T.P., Loukitcheva, A., Zemansky, J., Wheeler, R., Boneca, I.G. and Portnoy, D.A. (2014)
263 *Listeria monocytogenes* is resistant to lysozyme through the regulation, not the acquisition, of cell
264 wall-modifying enzymes. *J Bacteriol* 196(21), 3756-3767.
- 265 CLSI (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for
266 Bacteria Isolated from Animals: approved standard. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards
267 Institute Document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 268 Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of
269 persistent infections. *Sci* 284(5418), 1318-1322.
- 270 Ferris, R.A., Wittstock, S.M., McCue, P.M. and Borlee, B.R. (2014) Evaluation of biofilms in
271 gram-negative bacteria isolated from the equine uterus. *J Equine Vet Sci* 34,121.

- 272 Freitas, V. R., Sand, S.T.V. and Simonetti, A.B. (2010) Formação *in vitro* de biofilme por
273 *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta
274 rotação. *Rev Odontol UNESP* 39, 193-200.
- 275 Gionfriddo, J.R., Davidson, H., Asem, E. K. and Krohne, S. G. (2000) Detection of lysozyme in
276 llama, sheep, and cattle tears. *Am J Vet Res* 61, 1294–1297.
- 277 Gressler, L.T., Vargas, A.C., Costa, M.M., Sutili, F. J., Schwab, M., Pereira, D.I.B., Sangioni, L.A.
278 and Botton, S. A. (2015) Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with
279 macrolide resistance. *Pesqui Vet brasil* 35(10), 835-841.
- 280 Holby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of
281 bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35 (4), 322- 332.
- 282 Jacques, M., Aragon, V. and Tremblay, Y.D.N. (2010) Biofilm formation in bacterial pathogens of
283 veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 11, 97-121.
- 284 Kaplan, J.B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic
285 uses. *J Dent Res* 89, 205-218.
- 286 Libardoni, F., Scherer, C. F.C., Farias, L., Vielmo, A., Balzan, C. and Vargas, A. C. (2012)
287 *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesqui*
288 *Vet brasil* 32(8), 743-746.
- 289 Marques, S.C., Rezende, J.G.O.S., Alves, L.A.F., Silva, B.C., Alves, E., Abreu, L.R. and Piccoli,
290 R.H. (2007) Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces
291 and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol* 38, 538-543.
- 292 Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni,
293 P.L., Procopio, F. and Blanco, A.R. (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on
294 *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Medical Microbiol* 56(4), 519-
295 523.
- 296 O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu*
297 *Rev Microbiol* 54, 49-79.

- 298 Pearson, M., Laurence, C., Guinn, S. and Hansen, E. (2006) Biofilm Formation by *Moraxella*
299 *catarrhalis* in Vitro: Roles of the UspA1 Adhesin and the Hag Hemagglutinin. *Infect and Immun*
300 74, 1588-1596.
- 301 Peixoto, M.M.R., Gressler, L.T., Sutili, F.J., Costa, M.M. and Vargas, A.C. (2015) Ação dos
302 desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. *Pesqui Vet brasil* 35(2),
303 105-109.
- 304 Perez, A.C., Pang, B., King, L.B., Tan, L., Murrah, K.A., Reimche, J.L., Wren, J.T., Richardson,
305 S.H., Ghandi, U. and Swords, W.E. (2014) Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella*
306 *catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence *in*
307 *vivo*. *Pathog Dis* 70 (3), 280-288.
- 308 Postma, G.C., Carfagnini, J.C. and Minatel, L. (2008) *Moraxella bovis* pathogenicity: An update.
309 *Comp Immun, Microbiol Infect Dis* 31(6), 449-458.
- 310 Prieto, C., Serra, D.O., Martina, P., Jacobs, M., Bosch, A. and Yantorno, O.M. (2013) Evaluation of
311 biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine
312 keratoconjunctivitis. *Vet Microbiol* 166, 504–515.
- 313 Pugh, G.W. and McDonald, T.J. (1986) Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by
314 comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *Am J Vet Res* 47, 2343-2345.
- 315 Richards, J. J. and Melander, C. (2009) Controlling bacterial biofilms. *ChemBioChem* 10, 2287-
316 2294.
- 317 Salimena, A.P.S., Lange, C.C., Camussone, C., Signorini, M., Calvinho, L.F., Brito, M.A.V.P.,
318 Borges, C.A.V., Guimarães, A.S., Ribeiro, J.B., Mendonça, L.C. and Piccoli, R.H. (2016)
319 Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in
320 *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet Res*
321 *Commun* 40(3), 97-106.
- 322 SAS. Statistical Analysis System (2009) SAS/STAT user guide, Version 9.2. Cary, NC, USA.

- 323 Smith, A.W. (2005) Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial
324 resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev* 57(5), 1539-1550.
- 325 Stepanovic, S., Vuckoc, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Irkovic, I. and Ruzicka, F.
326 (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical
327 recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathol, Microbiol*
328 *Immunol Scand* 115, 891-9.
- 329 Tiba, M.R., Nogueira, G.R. and Leite, D.S. (2009) Estudo dos fatores de virulência associados à
330 formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com
331 cistite. *Rev Soc Brasil Med Trop* 42(1), 58-62.
- 332 Warren, J., Owen, A.R., Glanvill, A., Francis, A., Maboni, G., Nova, R.J., Wapenaar, W., Rees, C.
333 and Töttemeyer, S. (2015) A new bovine conjunctiva model shows that *Listeria*
334 *monocytogenes* invasion is associated with lysozyme resistance. *Vet Microbiol* 179(1-2), 76-81.
- 335 Watnick, P.I. and Kolter, R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholera* El Tor biofilm.
336 *Mol Microbiol* 34, 586-595.
- 337

Table 1: Biofilm formation capacity by *Moraxella* spp.

Species	Biofilm formation			Total (%, n° of isolates)
	Strong	Moderate	Weak	
<i>Moraxella bovis</i>	53.33% (8/15)	33.33% (5/15)	13.34% (2/15)	100% (15/15)
<i>Moraxella ovis</i>	33.33% (7/21)	33.33% (7/21)	33.34% (7/21)	100% (21/21)
<i>Moraxella bovoculi</i>	38.89% (7/18)	16.67% (3/18)	44.44% (8/18)	100% (18/18)

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of lysozyme against *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi* isolates.

<i>Moraxella</i> spp.		Number of isolates (%), MIC and MBC ($\mu\text{g/ml}$):						Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
		79.12	158.2 5	316.5	633	1266	>1266			
<i>M. bovis</i>	MIC	-	2 (20)	2 (20)	3 (30)	3 (30)	-	158.25 to 1266	633	1266
	MBC	-	-	-	-	1 (10)	9 (90)	1266 to >1266		
<i>M. ovis</i>	MIC	-	-	2 (18.2)	5 (45.4)	3 (27.3)	1 (9.1)	316.50 to >1266	633	1266
	MBC	-	-	-	-	-	11 (100)	>1266		
<i>M. bovoculi</i>	MIC	1 (8.3)	-	4 (33.3)	2 (16.7)	5 (41.7)	-	79.12 to 1266	633	1266
	MBC	-	-	-	3 (25)	1 (8.3)	8 (66.7)	633 to >1266		

MIC₅₀ - Minimal inhibitory concentration to inhibit the growth of 50% of the isolates; MIC₉₀ - Minimal inhibitory concentration to inhibit the growth of 90% of the isolates. The readings of the results were carried out after 48 h of incubation.

Table 3: Lysozyme action on biofilm formation by *Moraxella* spp.

Isolate (n=30)	Species	Value ¹	IC ²	Value	LAC ²
ATCC 10900	<i>M. bovis</i>	26.68	Strong	2.81	Moderate
SB 156/96	<i>M. bovis</i>	7.01	Strong	2.04	Moderate
Torres	<i>M. bovis</i>	9.06	Strong	1.86	Weak
SB 249/92	<i>M. ovis</i>	4.38	Strong	1.42	Weak
2439	<i>M. bovis</i>	2.42	Moderate	1.21	Weak
SBP 01/17 1	<i>M. bovis</i>	2.76	Moderate	1.83	Weak
SBP 01/17 3	<i>M. bovis</i>	3.92	Moderate	2.07	Moderate
SBP 01/17 6	<i>M. bovis</i>	2.12	Moderate	1.56	Weak
173	<i>M. bovis</i>	1.10	Weak	1.08	Weak
ATCC BAA1259	<i>M. bovoculi</i>	2.22	Moderate	1.51	Weak
2419	<i>M. bovoculi</i>	17.44	Strong	2.88	Moderate
JUR 5	<i>M. bovoculi</i>	6.45	Strong	1.67	Weak
JUR 3	<i>M. bovoculi</i>	7.43	Strong	1.38	Weak
SB 150/02 n°5	<i>M. bovoculi</i>	10.63	Strong	1.38	Weak
Jackson	<i>M. bovoculi</i>	24.4	Strong	1.14	Weak
NROA	<i>M. bovoculi</i>	2.35	Moderate	1.26	Weak
Água Doce	<i>M. bovoculi</i>	1.36	Weak	1.22	Weak
GF9	<i>M. bovoculi</i>	1.36	Weak	1.42	Weak
290	<i>M. bovoculi</i>	1.53	Weak	1.23	Weak
Viviane maior	<i>M. bovoculi</i>	1.57	Weak	1.22	Weak
R2	<i>M. bovoculi</i>	1.74	Weak	1.10	Weak
186 V	<i>M. bovoculi</i>	1.75	Weak	1.18	Weak
SB 06/08	<i>M. ovis</i>	3.61	Moderate	2.41	Moderate
SBP 07/13 2	<i>M. ovis</i>	5.71	Strong	1.13	Weak
SBP 07/13 3	<i>M. ovis</i>	24.12	Strong	1.70	Weak
ATCC 19575	<i>M. ovis</i>	1.28	Weak	1.14	Weak
SB 07/08	<i>M. ovis</i>	1.28	Weak	1.25	Weak
SBP 07/13 1	<i>M. ovis</i>	1.30	Weak	1.15	Weak
SB 326/07	<i>M. ovis</i>	2.36	Moderate	1.23	Weak
SB 247/92	<i>M. ovis</i>	1.13	Weak	1.19	Weak

¹ Value for classification of biofilm formation, where: weak = $OD_N < OD_{MI} < 2 \cdot OD_N$, moderate = $2 \cdot OD_N \leq OD_{MI} \leq 4 \cdot OD_N$ or strong = $4 \cdot OD_N < OD_{MI}$. ² Initial classification of each *Moraxella* spp isolate before the addition of lysozyme. ³ Classification after lysozyme action on each *Moraxella* spp. isolate evaluated.

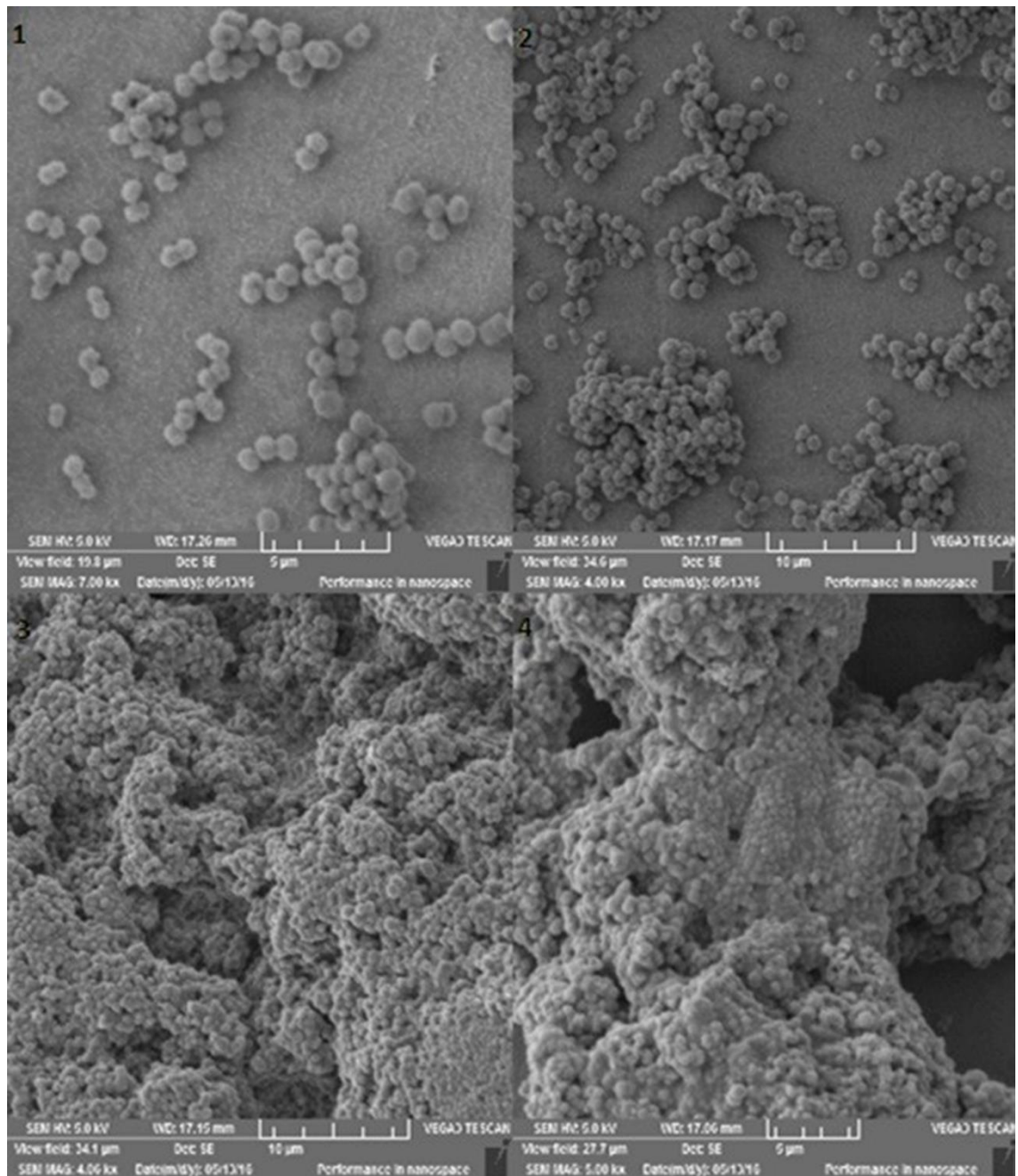


Figure 1: Scanning electron microscopy (SEM) of *Moraxella* spp. 1: ATCC 19575 (*M. ovis*); 2: ATCC BAA1259 (*M. bovoculi*); 3: ATCC 10900 (*M. bovis*); 4: Jackson/LABAC-UFSM (*M. bovoculi*). Where: 1- refers to the strain classified as weak biofilm producing, 2- as moderate, 3- and 4- as strong biofilm forming.

4. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi possível determinar:

- A formação de biofilmes por isolados de *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi* provenientes de casos clínicos de ceratoconjuntivite infecciosa em bovinos e ovinos;
- A lisozima apresenta atividade antibacteriana sobre os isolados de *M. bovis*, *M. ovis* e *M. bovoculi* em formas planctônicas;
- Entretanto, quando testada em formas sésseis, a lisozima não apresentou capacidade de erradicar os biofilmes, porém promoveu uma redução na produção destes;
- Em biofilmes consolidados não houve diminuição após o acréscimo da lisozima, demonstrando não haver ação desta enzima em biofilmes previamente estabelecidos.

Considerando esses resultados, é possível inferir que esta capacidade de formação de biofilmes por *M. bovis*, *M. ovis* e *M. bovoculi* e a resistência a concentrações de lisozima, iguais ou superiores aos níveis fisiológicos da lágrima de bovinos e ovinos, pode estar ligada não apenas à capacidade de colonizar a conjuntiva, mas também permanecer neste local mesmo após a cura das lesões, determinando a condição de indivíduo portador e constituindo um reservatório do agente etiológico da enfermidade em um rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, D. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 26, n. 3, p. 487–503, 2010.
- ANGELOS, J. A et al. Efficacy of florfenicol for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 1, p. 62–4, 2000.
- ANGELOS, J. A. et al. *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 789–795, 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. Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 61–79, 2015.
- ANGELOS, J. A.; BALL, L. M.; BYRNE, B. A. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 552–555, 2011.
- BROWN, M. H. et al. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, p. 259–266, 1998.
- BURNS, M. J.; O'CONNOR, A. M. Assessment of methodological quality and sources of variation in the magnitude of vaccine efficacy: A systematic review of studies from 1960 to 2005 reporting immunization with *Moraxella bovis* vaccines in young cattle. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 144–152, 2008.
- CHANDLER, R. L.; SMITH, K.; TURFREY, B. A. Ultrastructural and histological studies on the corneal lesion in infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 91, n. 2, p. 175–184, 1981.
- CHEN, L.; WEN, Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 66–73, 2011.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: approved standard. Clinical and Laboratory Standards Institute Document M31-A3. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.** Wayne, PA, 2008.
- CLUTTERBUCK, A. L. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1–2, p. 1–17, 2007.
- CONCEIÇÃO, F. R.; GIL TURNES, C. *Moraxella bovis*: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 779–788, 2003.
- COSTERTON, J. . et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435–464, 1987.

- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.
- DAGNALL, G. J. R. The role of *Branhamella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydia psittaci* in conjunctivitis of sheep. **British Veterinary Journal**, v. 150, n. 1, p. 65–71, 1994.
- DIAS, C. et al. Biofilm formation and multidrug resistant *Aeromonas* spp. from wild animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, n. 2010, 2017.
- ELLISON, R. T.; GIEHL, T. J. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1080–1091, 1991.
- FLEMING, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science**, v. 93, p. 306–317, 1922.
- FREITAS, V. R.; SAND, S. T. VAN DER; SIMONETTI, A. B. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 39, n. 4, p. 193–200, 2010.
- FRISCH, J. E. The relative incidence and effect of bovine infectious keratoconjunctivitis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Animal Production**, v. 21, n. 3, p. 265–274, 1975.
- FUNK, L. D. et al. Associations between infectious bovine keratoconjunctivitis at weaning and ultrasonographically measured body composition traits in yearling cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 1, p. 100–106, 2014.
- GEORGE, L. W.; SMITH, J. A. Treatment of *Moraxella bovis* infections in calves using a long-acting oxytetracycline formulation. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 1, p. 55–61, 1985.
- GIL TURNES, C. Pathogenicity of *Moraxella bovis* Strains. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, p. 503–504, 1983.
- GIONFRIDDO, J. R. et al. Detection of lysozyme in llama, sheep, and cattle tears. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 10, p. 1294–1297, 2000.
- GRESSLER, L. T. et al. Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with macrolide resistance. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 835–841, 2015.
- HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 322–332, 2010.
- HOU, Y. et al. Lysozyme associated liposomal gentamicin inhibits bacterial biofilm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–8, 2017.
- HUGHES, D. E.; PUGH JR, G. W.; MCDONALD, B. S. Ultraviolet radiation and *Moraxella bovis* in the etiology of bovine infectious keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 1331–1338, 1965.
- KAMARUZZAMAN, N. F. et al. Bactericidal and anti-biofilm effects of polyhexamethylene Biguanide in models of intracellular and biofilm of *Staphylococcus*

- aureus* isolated from bovine mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–10, 2017.
- KODJO, A.; EXBRAYAT, P.; RICHARD, Y. Identification of *Moraxella bovis* and related species from calves with IBK and goats by qualitative genetic transformation assay. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 41, p. 336–343, 1994.
- LASA, I. et al. Biofilms bacterianos e infección. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 28, n. 2, p. 163–176, 2005.
- LIBARDONI, F. et al. *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 743–746, 2012.
- LOY, J. D.; BRODERSEN, B. W. *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 6, p. 761–768, 2014.
- MABONI, G. et al. Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 545–549, 2015.
- MARQUES, S. C. et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 538–543, 2007.
- MCCONNELL, C. S.; SHUM, L.; HOUSE, J. K. Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 1–2, p. 65–69, 2007.
- 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, n. 6, 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.
- O’TOOLE, G. A. et al. Genetic approaches to study of biofilms. **Methods in Enzymology**, v. 310, p. 91–109, 1999.
- O’TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295–304, 1998.
- OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86–92, 2002.
- PERCIVAL, S. L.; GARCIA, A. B. Biofilms and Veterinary Medicine. In: **Biofilms and Veterinary Medicine**. Berlin: Springer Series on Biofilm, 2011. v. 6p. 69–110.
- POSTMA, G. C.; CARFAGINNI, J. C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 449–458, 2008.
- PRIETO, C. et al. Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the

- primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 504–515, 2013.
- PUGH, G. W.; HUGHES, D. E. Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sun lamp irradiation and *Moraxella bovis* infection: correlation of hemolytic ability and pathogenicity. **American Journal of Veterinary Research**, v. 29, n. 4, p. 835–839, 1968.
- PUGH, G. W.; HUGHES, D. E. Comparison of the virulence of various strains of *Moraxella bovis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 34, n. 4, p. 333–340, 1970.
- PUGH, G. W. J.; HUGHES, D. E. Bovine infectious keratoconjunctivitis: carrier state of *Moraxella bovis* and the development of preventive measures against disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 167, n. 4, p. 310–313, 1975.
- PUGH, G. W. J.; 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, n. 11, p. 2343–2345, 1986.
- QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. São Paulo: Artmed, 2005.
- RAGLAND, S. A.; CRISS, A. K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. 1–22, 2017.
- RICHARDS, J. J.; MELANDER, C. Controlling bacterial biofilms. **ChemBioChem**, v. 10, n. 14, p. 2287–2294, 2009.
- ROSSAU, R. et al. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 2, p. 310–319, 1991.
- RUEHL, W. W. et al. Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 168, p. 983–1002, 1988.
- SALIMENA, A. P. S. et al. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. **Veterinary Research Communications**, v. 40, n. 3–4, p. 97–106, 2016.
- SAS. **Statistical Analysis System** Cary, NC, USA., 2009.
- SNOWDER, G. D. et al. Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 507–518, 2005.
- SOSA, V.; ZUNINO, P. Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 11, p. 819–824, 2013.
- TASSEW, D. D. et al. Biofilm formation and determination of minimum biofilm eradication concentration of antibiotics in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 10, p. 1716–1720, 2017.

TIBA, M. R.; NOGUEIRA, G. P.; LEITE, D. D. S. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 58–62, 2009.

VERGARA, A. et al. Biofilm Formation and Its Relationship with the Molecular Characteristics of Food-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Food Science**, v. 82, n. 10, p. 2364–2370, 2017.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

WARREN, J. et al. A new bovine conjunctiva model shows that *Listeria monocytogenes* invasion is associated with lysozyme resistance. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1–2, p. 76–81, 2015.

WEBBER, J.; SELBY, L. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 179, p. 823–826, 1981.

ANEXO A

Comprovante da submissão do manuscrito à revista Journal of Applied Microbiology.

21/12/2017

Email – valessaely@hotmail.com

Manuscript submitted to Journal of Applied Microbiology - JAM-2017-2498

Applied Microbiology <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

qua 20/12/2017 13:39

Pereirasabott20@gmail.com <sabott20@gmail.com>;

Cc:valessaely@hotmail.com <valessaely@hotmail.com>; agueda.vargas@gmail.com <agueda.vargas@gmail.com>; mateus.matiuzzi@gmail.com <mateus.matiuzzi@gmail.com>; helinando.oliveira@univast.edu.br <helinando.oliveira@univast.edu.br>; luciana.forragicultura.ufsm@gmail.com <luciana.forragicultura.ufsm@gmail.com>; magdielelarp@gmail.com <magdielelarp@gmail.com>; wilton.taua@gmail.com <wilton.taua@gmail.com>; danielabrayer@gmail.com <danielabrayer@gmail.com>; lasangloni@gmail.com <lasangloni@gmail.com>; sabott20@gmail.com <sabott20@gmail.com>;

20-Dec-2017

Dear Dr. Botton

The following manuscript has been successfully submitted to Journal of Applied Microbiology.

Manuscript ID: JAM-2017-2498

Title: Moraxella bovis, Moraxella ovis and Moraxella bovoculi: Biofilm formation and lysozyme activity
Authors: Ely, Valessa; Vargas, Agueda; Costa, Mateus; Oliveira, Helinando; Pötter, Luciana; Reghelin, Magdiel; Fernandes, Antônio; Brayer Pereira, Daniela Isabel; Sangioni, Luis; Botton, Sônia

If there are any errors in the manuscript details above or in your contact details, please contact us at jamlam@wiley.com.

Your manuscript will now be checked for compliance with the guidelines to authors, and you will be contacted if further information is required. Once the submission is confirmed as complete, the Chief Editor will then assign the manuscript to a handling Editor, who assesses the manuscript for suitability in the journal. At this screening stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal, and authors should not expect full comments if papers are rejected at this stage. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript.

You can keep track of your manuscript by logging on to ScholarOne Manuscripts at: <https://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>.

The summary status of your manuscript will be displayed in your Author Centre. Should you have any queries please contact jamlam@wiley.com, using your Manuscript ID as a reference.

Co-authors: Please contact me at jamlam@wiley.com as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript. As co-author, you will not be contacted again during the review process of this manuscript; all further correspondence will be sent to Dr. Sônia Botton.

Thank you for your submission to Journal of Applied Microbiology.