

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

**ANÁLISE GENOTÍPICA E FILOGENÉTICA COM
BASE NOS GENES DO PILUS TIPO IV DE
Moraxella bovis E CITOTOXINA DE *M. bovis*,
Moraxella bovoculi e *Moraxella ovis***

TESE DE DOUTORADO

Luana D'Avila Farias

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**ANÁLISE GENOTÍPICA E FILOGENÉTICA COM BASE NOS
GENES DO PILUS TIPO IV DE *Moraxella bovis* E DA
CITOTOXINA DE *M. bovis*, *Moraxella bovoculi* E *Moraxella ovis***

Por

Luana D'Avila Farias

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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
Doutor em Medicina Veterinária

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

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Farias, Luana D`Avila
ANÁLISE GENOTÍPICA E FILOGENÉTICA COM BASE NOS GENES
DO PILUS TIPO IV DE *Moraxella bovis* E CITOTOXINA DE *M.*
bovis, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* / Luana
D`Avila Farias.-2015.
121 p.; 30cm

Orientadora: Agueda Castagna de Vargas
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. Ceratoconjuntivite infecciosa bovina 2. *Moraxella*
spp. 3. *Pilina bacteriana* 4. Citotoxina bacteriana 5.
Genes de virulência I. Castagna de Vargas, Agueda II.
Título. |

©2015

Todos os direitos autorais reservados a Luana D'Avila Farias. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

E-mail: luana.vett@gmail.com

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ANÁLISE GENOTÍPICA E FILOGENÉTICA COM BASE NOS GENES
DO PILUS TIPO IV DE *Moraxella bovis* E DA CITOTOXINA DE *M. bovis*,
Moraxella bovoculi E *Moraxella ovis***

elaborada por
Luana D'Avila Farias

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Agueda Castagna de Vargas, Dr.
(Presidente/Orientador)

Charles Fernando Capinos Scherer, PhD. (HIPRA)

Fernando Rosado Spilki, Dr. (FEEVALE)

Letícia Beatriz Matter, Dr. (URI)

Rafael Frandoloso, Dr. (UPF)

Santa Maria, 16 de janeiro de 2015

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar o doutorado em um programa de excelência da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À minha orientadora professora Agueda Castagna de Vargas pelo exemplo profissional.

A todos os colegas do Setor de bacteriologia que se fizeram presentes durante esta etapa...Felipe Libardoni, Letícia Gressler, Claudia Balzan e Julia Espíndola e em especial à professora e colega Letícia B. Matter e à colega Grazieli Maboni pela disponibilidade e auxílio na condução deste trabalho.

Ao Mauro H. Antonini Mello por ser parte indispensável da minha vida, e por colaborar em diversas etapas desta tese.

Aos meus pais, que acreditaram nos meus sonhos e me permitiram me dedicar a Medicina Veterinária, que tanto amo.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, meu muito obrigado!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ANÁLISE GENOTÍPICA E FILOGENÉTICA COM BASE NOS GENES DO PILUS TIPO IV DE *Moraxella bovis* E DA CITOTOXINA DE *M. bovis*, *Moraxella bovoculi* E *Moraxella ovis*

AUTOR: Luana D'Avila Farias
ORIENTADOR: Agueda Castagna de Vargas
Santa Maria, 16 de janeiro de 2015.

Historicamente, acreditava-se que a ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) estava sob competência exclusiva de *Moraxella bovis*. Contudo, outras espécies do Gênero *Moraxella* também vêm sendo estudadas quanto à participação na patogenia da CIB, como *Moraxella ovis* e principalmente *Moraxella bovoculi*. Esta tese descreve análises filogenéticas e de dados genotípicos com base nos genes codificadores dos pili tipo IV dos tipos Q e I (TfpQ/I) de *M. bovis* e da citotoxina de *M. bovis* (MbxA), *M. bovoculi* (MbvA) e *M. ovis* (MovA). A diferenciação entre *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* foi previamente realizada por PCR (região intergenica 16S-23S) conforme protocolo estabelecido na literatura. Após, é descrita uma análise molecular com base na região 3' dos genes *tfpQ/I* (compreendendo subdomínio α 1-C N-terminal e o domínio C-terminal) de 16 isolados de campo e cinco cepas vacinais de *M. bovis*, provenientes da América do Sul. Todas as 47 sequências do gene *tfp* tipo Q e tipo I analisadas resultaram em 31 alelos designados de 1 até 31. A reconstrução filogenética resultou em uma distinção dos 31 alelos em onze grupos (designados de A até J e Epp). A análise da sequência de aminoácidos (aa) deduzidos da região C-terminal mostrou níveis de similaridade entre 67 e 100% dentro dos grupos, enquanto a análise da região D (subunidade C-terminal) resultou níveis de similaridade entre 60 e 100%. Além disso, um estudo filogenético com base na região 3' dos genes da citotoxina foi realizado para investigar a relação genética entre os isolados de *M. bovis* (n = 17), *M. bovoculi* (n = 11) e *M. ovis* (n = 7) e cepas de referência. A reconstrução filogenética permitiu a diferenciação entre as espécies, sendo que os isolados mais antigos de *M. bovoculi* permaneceram em ramo mais próximos aos isolados de *M. bovis*. O nível de similaridade de aminoácidos entre as sequências de MbxA ficou em 99.9% de média, enquanto entre as sequências de MbvA e MovA foi respectivamente de 98.8% e 99.3%. A similaridade entre MbvA e MovA foi de 96.6%, enquanto MbxA em relação a MbvA e MovA foi de 77.6%. Assim, é possível concluir que o gene *tfp* pode ser adequado para inferir distinção entre os isolados de *M. bovis*, enquanto o gene codificador da citotoxina é adequado para classificação filogenéticas dos isolados de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*, e, talvez para a compreensão das relações evolutivas.

Palavras-chave: CIB, T4p, PilA, toxinas RTX, hemolisina, citolisina, filogenia.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

GENOTYPIC ANALYSIS AND PHYLOGENY BASED ON TYPE IV PILUS GENE OF *Moraxella bovis* AND CYTOTOXIN GENE OF *M. bovis*, *Moraxella bovoculi* AND *Moraxella ovis*

AUTHOR: Luana D'Avila Farias
ADVISER: Agueda Castagna de Vargas
Santa Maria, January 16th, 2015

Historically, infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) was believed to be under the exclusive competence of *Moraxella bovis*. However, the roles of other species of Genus *Moraxella* are also being considered in the pathogenesis of IBK, such as *Moraxella ovis* and particularly *Moraxella bovoculi*. This thesis describes phylogenetic and genotypic analysis based on the genes encoding type IV pili Q- and I-type (TfpQ/I) of *M. bovis* and cytotoxin of *M. bovis* (MbxA), *M. bovoculi* (MbvA) and *M. ovis* (MovA). The distinction between *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* was previously performed by PCR (16S-23S intergenic region) according to the protocol established in the literature. Then, there is described a molecular analysis based on the 3' region of genes tfpQ/I (including α 1-C N-terminal subdomain and C-terminal domain) of 16 field strains and five vaccine strains of *M. bovis* from South America. All 47 sequences of tfp Q- and I-type genes analyzed resulted in 31 alleles designated 1 to 31. The phylogenetic reconstruction resulted in a distinction of 31 alleles in eleven groups (designated A through J and Epp). The analysis of the deduced amino acid sequence (aa) of the C-terminal region showed similarity levels between 67 and 100% within the groups, while the analysis of the D region (C-terminal subunit) resulted in levels of similarity between 60 and 100%. In addition, a phylogenetic analysis based on the 3' region of the cytotoxin gene was performed to investigate the genetic relationship among *M. bovis* (n = 17), *M. bovoculi* (n = 11) and *M. ovis* (n = 7) strains and reference strains. Phylogenetic reconstruction allowed the differentiation among species, and the older *M. bovoculi* strains remained in branch closer to *M. bovis* strains. The amino acid similarity level among the MbxA sequences stood at an average of 99.9%, while among the MbvA and MovA sequences the similarity was respectively 98.8% and 99.3%. The similarity between MbvA and MovA was 96.6%, while MbxA for MbvA and MovA was 77.6%. Thus, it is possible to conclude that the *tfp* gene may be inferred suitable for differentiate among *M. bovis* strains, while the cytotoxin-encoding gene is suitable for phylogenetic classification of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* strains and perhaps for understanding the evolutionary relationships among three species.

Keywords: Pinkeye, T4p, P1A, RTX toxin, hemolysin, cytolysin, phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Estrutura da pilina tipo IV. Domínio N-terminal (constante) compreende a α -hélice, a qual é dividida nos subdomínios, α -1N e α -1C. Domínio C-terminal (variável) compreende o $\alpha\beta$ -loop, as folhas- β e a região-D. A sequência líder (sinal tipo III) está presente apenas na pré-pilina (Fonte: CRAIG et al., 2004; CRAIG & LI, 2008). **27**

Figura 2 - Representação esquemática da região cromossomal de *M. bovis* na qual ocorre a fase de variação dos pili tipo IV. (A) Representação da região cromossomal de 2,1Kb (delimitada pelas invertases) que sofre a inversão de DNA. As ORFs, assim como a sua orientação estão indicadas pelas setas, as linhas pretas indicam a parte de DNA não codificada. Na orientação 1 o gene *tfpQ* está na direção da expressão, na orientação 2 o gene *tfpI* está na direção da expressão. (B) Conforme o gene *tfpQ/I* que estiver a jusante da sequência líder (que se mantém fixa) será expressa um tipo de pilina. Contudo ambas TfpQ e TfpI apresentam a mesma conformação, com a maior variação entre elas ocorrendo na região C-terminal (Fonte: Fulks et al., 1990). **33**

Figura 3 - Operon RTX e estrutura da proteína RtxA. Diagrama superior: representação esquemática de um típico operon RTX : o produto dos quatro genes, C (ativador), A (toxina estrutural), B e D (proteínas de secreção tipo I). O operon RTX é representado por caixas abertas na ordem que geralmente são codificados. Diagrama inferior: representação das principais partes funcionais da toxina. GK indica o local de acilação da lisina-glicina, que é seguido pelo local das repetições ricas em glicina e ácido aspártico (Fonte: FREY, 2011; ANGELOS et al., 2003). **37**

CAPÍTULO 2

Figura 1 - (Fig. 1.) Schematic representation of type 4 pili of *M. bovis* with the DNA inversion region and location of the primers used for PCR and sequencing. (A) Invertible DNA sequence comprising the two genes *tfpI* and *tfpQ* in opposite orientation. (B) Arrows indicate the site outside the regions of the invertible segment of *M. bovis* Epp63 strain (GenBank ID M32345) used to design the pair of primer (P1 and P2). P1 corresponds to nucleotide 845-866 which comprises part of the leader sequence (black) and N-terminal of mature protein. P2 corresponds to nucleotide 3070-3051 comprising *piv_{mb}* gene that encode Piv-mediated site-specific DNA inversion. **69**

Figura 2 - (Fig. 2.) Deduced amino acid sequence alignment of the C-terminal gene of *Moraxella bovis* pili (from residue 54). Alleles are identified by the group (letter) followed by allele (number). Alleles that include reference strains are in bold. In addition, alleles of the seven prototype serogroups strains are underlined. Sequences are subdivided according to the eleven groups formed from the phylogenetic analysis and identity: Cluster I- A (n = 2), B (n = 3), D (n = 4), F (n = 6), and Epp (n = 5); Cluster II - C (n = 7), E (n = 10), G (n = 5), I (n = 1), and J (n = 3); Cluster III - H (n = 2). **70**

Figura 3 - (Fig.3.) Phylogenetic tree inferred by the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model for the nucleotide sequence of the 3' region of type IV pili (*tfpQ/I*) gene of *Moraxella bovis* strains. Field strains (n = 16) from Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) are indicated by white triangle; vaccine (n = 5) are indicated by grey circle; black triangle indicate reference strains. Only bootstraps value higher than 50% of 1000 replicates are shown. There were a total of 367 positions in the final dataset. **71**

CAPÍTULO 3

Figura 1 - (Fig. 1) Phylogenetic analysis of 3' region of cytotoxin (*mbxA*, *mbvA*, *movA*) of *Moraxella* spp. strains was performed with MEGA 6, using 277 amino acid positions. Only bootstrap values higher than 50% of 1000 were displayed. (A) the evolutionary history was estimated by the neighbour-joining method based on the p-distance model. The tree contains two main branches, in one branch are the *M. bovis* alleles (1bx and 2bx alleles), while another branch was separated between *M. bovoculi* alleles (1bv, 2bv, 3bv, 4bv, 5bv, 6bv and 7bv alleles) and *M. ovis* (1ov, 2ov, 3ov, 4ov, 5ov and 6ov alleles). The *M. ovis* strains were still divided according to the year of isolation: (a) strains isolated before or in 2005, (b) strains isolated after 2007. (B) the evolutionary history was estimated by the likelihood method based on Whalen e Goldman (WAG) model (2001). The tree also originated two main branches, in one branch are the *M. bovis* alleles, whereas another branch contains the older *M. bovoculi* allele (3bv allele, strains isolated before 1990), the remaining alleles of *M. bovoculi* and the *M. ovis* . Similarly, *M. ovis* strains according to the year of isolation..... **95**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. - Espécies de *Moraxella* isoladas a partir de animais **19**

CAPÍTULO 2

Tabela 1. - (Table 1) *Moraxella bovis* isolated from Brazil (BR), Uruguay (UY) and Argentina (AR) and reference strains included in the present study **67**

Tabela 2. - (Table 2) Similarity levels among the deduced amino acids (aa) sequences of the 3' region of type IV pili gene of *Moraxella bovis* field/vaccine isolates and reference strains divided in 31 alleles into 11 groups..... **68**

CAPÍTULO 3

Tabela 1. - (Table 1) *Moraxella bovoculi*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovis* strains from IK outbreaks and the reference strains. **92**

Tabela 2. - (Table 2) Primers used in the PCR assays..... **93**

Tabela 3. - (Table 3) Differences found in comparison to the amino acid sequences of 3' region of cytotoxin genes (*mbvA* and *movA*) between 11 *Moraxella bovoculi* strains and eight *Moraxella ovis* strains, and *mbxA* gene of 17 *Moraxella bovis* strains at the same positions.. **94**

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A** – Nível de similaridade entre as sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácido deduzidos (aa) da região 3' do gene pili tipo IV (subdomínio α -1C N-terminal e domínio C-terminal) dos isolados de campo e das cepas vacinais e de referência de *Moraxella bovis*... **119**
- Apêndice B** – Sequência de aminoácidos deduzidos da região C-terminal do gene pili tipo IV dos isolados de campo e das cepas vacinais e de referência de *Moraxella bovis*. As sequências estão identificadas com letras (grupo) e números (alelo) e estão divididas nos clusters I, II e III. Abaixo é mostrada a divisão quanto às partes do domínio C-terminal. **120**
- Apêndice C** – Sequência de aminoácidos deduzidos da região C-terminal do gene da citotoxina dos isolados de *M. bovoculi* (bv), *M. ovis* (ov) e *M. bovis* (bx). Cada espécie do Gênero *Moraxella* ainda está dividida em alelos..... **121**

SUMARIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura.....	17
1. Gênero <i>Moraxella</i> spp.	18
1.1 <i>Moraxella bovis</i>	22
2. Pili (Pili Tipo IV).....	24
2.1 Pili tipo IVa de <i>M. bovis</i>	30
3. Citotoxina (Toxinas RTX).....	35
3.1. Toxina RTX em <i>Moraxella</i> spp. de interesse veterinário (MbxA, MbvA e MovA).....	38
CAPÍTULO 2 - Phylogenetic and genetic diversity analysis of <i>Moraxella bovis</i> type four pilin Q/I genes	42
Abstract.....	43
Introduction	44
Material and methods	45
Results	49
Discussion.....	55
Conclusion.....	61
References	62
CAPÍTULO 3 - Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3' region of <i>rtxA</i> gene from geographically diverse isolates of <i>Moraxella bovis</i>, <i>Moraxella bovoculi</i> and <i>Moraxella ovis</i>.....	72
Abstract.....	73
Introduction	74
Materials and methods.....	74
Results	77
Discussion.....	84
Conclusion.....	88
References	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICES.....	118

INTRODUÇÃO

A família *Moraxellaceae* inclui majoritariamente gammaproteobactérias de vida livre, mas também existem espécies deste grupo que são parasitas, em geral inofensivos, das mucosas dos mamíferos (ROSSAU et al., 1991). No entanto as espécies *Moraxella bovis* (*M. bovis*), *Moraxella bovoculi* (*M. bovoculli*) e *Moraxella (Branhamella) ovis* (*M. ovis*), pertencentes à família *Moraxellaceae*, alvos deste estudo, são, ou suspeita-se que sejam, espécies patogênicas de importância veterinária (ANGELOS, 2010a,b; O'CONNOR et al., 2012).

Espécies do gênero *Moraxella* estão envolvidas de alguma forma na ceratoconjuntivite infecciosa (CI), também conhecida como *pinkeye* e oftalmia contagiosa, acometendo ruminantes, principalmente bovinos (POSTMA, 2008; ALEXANDER, 2010). Embora não seja uma doença fatal, a CI é extremamente contagiosa e tem recebido considerável atenção devido a sua distribuição mundial e ao seu impacto econômico (SLATTER et al., 1982a, 1982b; POSTMA, 2008).

Esta doença tem sido diagnosticada na maioria dos estados brasileiros, assim como no Uruguai, na Argentina, no Paraguai e no Chile (GIL-TURNES, 2007). Por este motivo, a CI foi uma das oito doenças escolhidas para serem estudadas no projeto regional cooperativo PROCISUR (Programa de desenvolvimento científico) do Mercosul, hoje Cone Sul, pela Argentina, Brasil e Uruguai (CONCEIÇÃO & GIL-TURNES, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2003).

A principal espécie envolvida na CI é chamada de *Moraxella bovis*, até o momento, a única para a qual os postulados de Koch foram estabelecidos satisfatoriamente em bovinos (HENSON & GRUMBLES, 1960; ANGELOS et al., 2010a). Além disso, outras espécies de *Moraxella* também parecem ter envolvimento em doenças de interesse veterinário, este é o caso de *Moraxella ovis*, agente em casos de CI em ovinos e caprinos (SPRADBROW, 1971; BANKEMPER et al., 1990; DAGNALL, 1994) também relatados no Brasil (NADALINI et al., 1991; CHAVES et al., 2008). Não obstante existem raros casos de CI causadas por *M. ovis* em outras espécies de ruminantes como veados e alces (DUBAY et al., 2000).

No caso dos bovinos, há algum tempo vem se sugerindo que outras bactérias do gênero *Moraxella* possam estar associadas à causa da CI (ANGELOS, 2010a, 2010b). Esta suspeita se apoia na incerteza da eficácia de vacinas comerciais para CI (BURNS &

O'CONNOR, 2008), nas quais as cepas vacinais são *M. bovis*, e no relato de isolamento de microrganismo semelhante a *M. bovis* das lesões de CI. Por muito tempo a suspeita recaiu sobre *M. ovis* (*M. ovis*-like, *Branhamella ovis* ou *Branhamella ovis*-like) (FAIRLIE, 1966; ELAD et al., 1988). Contudo, uma nova espécie chamada *Moraxella bovoculi* vem sendo isolada da secreção ocular de bovinos saudáveis e com CI (ANGELOS et al., 2007a; LIBARDONI et al., 2012; O'CONNOR et al., 2012; SOSA & ZUNINO, 2013). Assim, alguns autores sugerem que a vasta maioria dos isolados recuperados de secreções oculares de bovinos com CI, anteriormente identificados como *M. ovis*, agora seriam reclassificados como *M. bovoculi* (O'CONNOR et al., 2012).

Embora *M. bovoculi* e *M. ovis* já tenham sido identificados a partir do fluido ocular e trato respiratório de bovinos saudáveis e doentes (ELAD et al., 1988; ANGELOS et al., 2007a; CATRY et al., 2007; LIBARDONI et al., 2012; SOSA & ZUNINO, 2013) e expressem genes de virulência semelhantes a *M. bovis* (ANGELOS et al., 2007c; CERNY et al., 2006), ainda não foi possível estabelecer o papel destas espécies na patogenia da CI (ANGELOS, 2010a; GOULD et al., 2013;).

De fato, *M. bovis* é o microrganismo mais pesquisado dentre as três espécies de interesse neste estudo, e para o qual já foram estabelecidas premissas, tais como os principais fatores de virulência sem os quais a doença não se estabeleceria ou não se apresentaria de forma tão severa (PUGH & HUGHES, 1976; ANNUAR & WILCOX, 1985; BEARD & MOORE, 1994).

Os fatores de virulência associados a *M. bovis* considerados pré-requisitos para a indução da CI são os pili tipo IV (Tfp), que ocasionam a aderência microbiana à superfície da célula do hospedeiro (ANNUAR & WILCOX, 1985; JAYAPPA & LEHR et al., 1986) e a secreção da toxina com propriedades hemolítica e leucolítica (MbxA) (PUGH & HUGHES, 1968, 1970; BEARD & MOORE, 1994; HOIEN-DALEN et al., 1990).

A citotoxina de *M. bovis* pertence à família de proteínas RTX (*repeats in the structural toxin*) (ANGELOS et al., 2001) e está contida em um operon RTX designado em *M. bovis* de operon *mbx* (ANGELOS et al., 2003) formando uma ilha de patogenicidade (HESS & ANGELOS, 2006). Ambas *M. ovis* e *M. bovoculi* também apresentam o gene codificador da citotoxina respectivamente chamados de *movA* e *mbvA* (ANGELOS et al., 2007c), assim como todo o operon RTX encontrado em cepas patogênicas de *M. bovis* (ANGELOS et al., 2003).

O gene do pilus tipo IV, relevante para colonização do hospedeiro, foi observado recentemente em *M. bovoculi* (CALCUTT et al., 2014), mas ainda não em *M. ovis*. Contudo,

M. bovoculi revelou um único gene codificador da pilina, uma situação diferente do que ocorre nas cepas de *M. bovis*, nas quais um sistema de inversão orquestra a variação de fase entre dois genes de pilina, chamados de *tfpQ* e *tfpI* (MARRS et al., 1988; FULKS et al., 1990).

Em adição à variação de fase, os isolados de *M. bovis* também são divididos em sete sorogrupos (de A até G) com base na variação antigênica dos pili observados em testes sorológicos com isolados de algumas partes do mundo (Austrália, Estados Unidos, Reino Unido e Nova Zelândia) e as cepas protótipos de cada sorogrupo (MOORE & LEPPER, 1991). Variações antigênicas também foram observadas, por reação cruzada, em isolados de *Moraxella* spp. coletados de bovinos com CI originários da América do Sul, porém sem a utilização das cepas protótipo tidas como padrão para a classificação nos sorogrupos previamente conhecidos (CONCEIÇÃO et al., 2003, 2004).

Além de ser o principal fator de virulência descrito para *M. bovis*, o pilus tipo IV também apresenta potencial antigênico e imunogênico, alcançando certo êxito na prevenção e/ou controle da CI nos rebanhos bovinos (LEHR et al., 1985; LEPPER, 1988; ANGELOS et al., 2007b). No entanto, devido à variação de fase e à variação antigênica, tem-se encorajado a pesquisa de outras proteínas com sequências mais conservadas entre as cepas para serem usadas na imunização dos animais (MCCONNELL & HOUSE, 2005). Neste contexto, as MbxA de diferentes cepas de *M. bovis* mostraram conservada antigenicidade em pesquisas envolvendo anticorpos neutralizantes (BILLSON et al., 1994; HOIEN-DALEN et al., 1990), assim como, conservada sequência genética entre cepas oriundas de diversas áreas dos Estados Unidos (ANGELOS & BALL, 2007a). De fato, estudos recentes utilizando a citotoxina de *M. bovis* como antígeno vacinal, tanto na forma nativa (GEORGE et al., 2005) quanto subunidade recombinante (ANGELOS et al., 2004), demonstraram redução nas proporções de córneas ulceradas em bezerros vacinados em relação aos não vacinados. Assim, as últimas pesquisas sugerem que a MbxA pode representar um dos antígenos mais adequados para uma vacina de CI, dentre as proteínas pesquisadas até o momento (ANGELOS et al., 2004; GEORGE et al., 2004; GEORGE et al., 2005). No entanto, a pilina não é descartada como antígeno vacinal, uma vez que os vários sorogrupos de *M. bovis* mostram uma região N-terminal conservada (ATWELL et al., 1994), bem como uma imunorreatividade entre determinantes antigênicos partilhados (GREENE et al., 2001a,b). Em adição, quando comparados os resultados de uma vacina recombinante contendo pilina + citotoxina de *M. bovis* com uma contendo apenas citotoxina, embora não tenha havido diferença significativa, a proporção cumulativa reduzida de CI nos bezerros vacinados com pilina + citotoxina sugere

que esta possa proporcionar uma vantagem sobre uma vacina apenas com citotoxina (ANGELOS et al., 2007b).

Nesse contexto, a análise das sequências de nucleotídeos de genes codificadores de proteínas envolvidas na patogenia da CI e com potencial para assumir papel na profilaxia da doença pode auxiliar na identificação e classificação das principais diferenças entre as espécies e dentro de cada espécie do gênero *Moraxella* supostamente envolvidas. Dessa forma, o estudo dos genes codificadores da proteína Tfp, entre os isolados de *M. bovis*, e da proteína RTX, entre as espécies e dentro das espécies de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*, podem auxiliar no entendimento das bases moleculares dessas bactérias e sua provável relação com a patogenia da CI. Pode ainda contribuir na resolução das implicações para o diagnóstico, vacinação e programas de controle e erradicação da doença e disponibilização de técnicas de diagnóstico diferencial entre *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*, assim como entre os diversos sorogrupos de *M. bovis*. Ainda, a reprodutibilidade e a portabilidade dos resultados moleculares obtidos neste estudo podem permitir a comparação molecular de cepas bacterianas da América do Sul com cepas de outras partes do mundo.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

A família *Moraxellaceae* tem um longo histórico de debates e mudanças. Certamente as novas técnicas moleculares têm facilitado enormemente as definições atuais. No entanto, ainda não se chegou a um consenso sobre o posicionamento taxonômico definitivo de cada gênero.

A princípio o gênero *Moraxella*, que foi proposto pela primeira vez por Lwoff em 1939, foi incluído na família *Neisseriaceae* em 1968 por Henriksen e Bøvre com base em semelhanças fenotípicas e dados de transformação genética (BØVRE, 1979). Mais tarde Bøvre (1984) arguiu que o gênero consistia de dois subgêneros, *Moraxella* (*Moraxella*) e *Moraxella* (*Branhamella*), ainda dentro da família *Neisseriaceae*. Em 1989, Rossau et al. propuseram excluir da família *Neisseriaceae* o subgênero *Moraxella* e os gêneros *Acinetobacter* e *Psychrobacter* e sugeriram a criação de uma nova família taxonômica para incluí-los (ROSSAU et al., 1991). Em oposição, Catlin (1991) sugeriu que apenas os gêneros *Moraxella* e *Branhamella* fossem posicionados dentro da nova família chamada *Branhamaceae*.

Pettersson et al. (1998) revisaram o status taxonômico destas espécies por meio da análise filogenética do gene 16S rRNA, fornecendo dados para a classificação das espécies em quatro subgrupos dentro da família, agora chamada, *Moraxellaceae*. O primeiro subgrupo, chamado subgrupo *Moraxella lacunata*, limitou o autêntico gênero *Moraxella*, incluindo *Moraxella lacunata*, *Moraxella nonliquefaciens*, *Moraxella bovis*, *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella ovis*, *Moraxella caviae*, *Moraxella cuniculi* e a cepa [*Alysiella*] ATCC 29468 e HIM 1018-2 (que se tornam *Moraxella* sp.).

No entanto, somente em 2001, Euzéby solicitou que os subgêneros *Moraxella* e *Branhamella* e nove espécies incluídas nos subgêneros fossem validamente publicados.

O parecer Judicial 83 decidiu que os nomes dos subgêneros *Moraxella* subgen. *Moraxella* e *Moraxella* subgen. *Branhamella* deveriam ter sido incluídos na *Approved Lists of Bacterial Names* (LPSN). Contudo, Tindall (2008) contestou o parecer judicial 83. Após uma

reunião judicial em Istambul na Turquia, os nomes *Moraxella* (subgen. *Moraxella*) e *Moraxella* (subgen. *Branhamella*) foram excluídos do LPSN.

1. Gênero *Moraxella* spp.

Espécie-tipo: *Moraxella lacunata*. Lwoff 1939 (Approved Lists 1980), onde há citação de 22 espécies incluídas no gênero *Moraxella* spp..

Sinônimo: "*Diplobacillus*".

Etimologia: N.L. fem. dim. n. *Moraxella*, em homenagem a Victor Morax, o oftalmologista suíço que foi o primeiro a reconhecer espécies do gênero (típica) (SKERMAN et al, 1980).

As bactérias do gênero *Moraxella*, compreendidas na classe das Proteobacterias (ROSSAU et al., 1991), se apresentam na forma de bastonetes curtos, cocobacilos ou cocos (ANGELOS., 2010b). A parede celular é típica das bactérias gram-negativas sendo composta de lipopolissacarídeos e proteínas, contudo, em contraste a muitos outros microrganismos gram-negativos, o lipopolissacarídeo não contém unidades repetidas do antígeno O.

As células não são móveis em meios líquidos, mas a motilidade pode ser observada quando ligada à superfície. Todas as cepas são oxidase e catalase positivas, embora alguns autores considerem a catalase variável (VAN HALDEREN & HENTON, 2004) e não produzem DNase, urease, indol e sulfeto de hidrogênio.

Todas as espécies têm fimbrias (pili) e, com exceção da *Moraxella bovis*, são encapsuladas, embora van Halderen e Henton (2004) afirmem que a capsula pode estar presente em isolados recentes. Elas utilizam compostos orgânicos como fontes de energia (quimiorganotróficas) e são estritamente aeróbias e assacarolíticas (PETTERSSON et al., 1998).

O seu ótimo crescimento ocorre na temperatura entre 33 e 35°C. Várias espécies são fracamente hemolíticas no ágar sangue e o crescimento é variável no agar MacConkey. Devido a sua relativa inércia, laboratórios clínicos frequentemente encontram problema na definição das espécies.

Algumas cepas são parasitas das membranas mucosas de animais e seres humanos, ocasionalmente provocando infecções. Vinte e duas espécies já foram descritas, destas, onze foram isoladas a partir de animais saudáveis ou doentes (Tabela 1).

Na perspectiva veterinária a ceratoconjuntivite infecciosa (CI), também conhecida como *pinkeye*, oftalmia contagiosa, lágrima branca ou olho branco, é a principal doença causada por uma ou mais espécies do gênero *Moraxella*, e que acomete especialmente bovinos. A CI tem recebido considerável atenção devido a sua distribuição mundial e ao seu impacto econômico.

A principal espécie envolvida na CI é chamada de *Moraxella bovis*, até o momento, a única para a qual os postulados de Koch foram estabelecidos satisfatoriamente para CI em bovinos (HENSON & GRUMBLES, 1960; ANGELOS et al., 2010a). Além disso, outras espécies de *Moraxella* também parecem causar doenças de interesse veterinário, este é o caso de *Moraxella ovis*, anteriormente chamada de *Neisseria ovis* (LINDQVIST, 1960) e *Branhamella ovis*. *M. ovis* aparece como agente da CI principalmente de ovinos e caprinos, com relatos em várias partes do mundo (SPRADBROW, 1971; DAGNALL, 1994; BANKEMPER et al., 1990) inclusive no Brasil (NADALINI et al., 1991; CHAVES et al., 2008). Não obstante existem raros casos de CI causadas por *M. ovis* em outros animais como veados, alces (DUBAY et al., 2000) e bovinos (ELAD et al., 1988).

Tabela 1. Espécies de *Moraxella* isoladas a partir de animais

Espécie de <i>Moraxella</i>	Animal fonte
<i>Moraxella bovis</i>	Rebanho com ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB)
<i>Moraxella bovoculli</i>	Rebanho com CIB
<i>Moraxella ovis</i>	Ovinos com conjuntivite (oftalmia contagiosa)
<i>Moraxella oblonga</i>	Cavidade oral de ovinos
<i>Moraxella canis</i>	Focinho de cães e gatos saudáveis
<i>Moraxella boevei</i>	Cavidade nasal de caprinos saudáveis
<i>Moraxella caprae</i>	Cavidade nasal de caprinos saudáveis
<i>Moraxella caviae</i>	Faringe de porco da Índia saudável
<i>Moraxella cuniculi</i>	Nasofaringe de coelho
<i>Moraxella equi</i>	Equino com conjuntivite
<i>Moraxella anatipestifer</i>	Patinhos com septicemia

Fonte: Angelos. In: Gyles et al., 2010b.

No caso dos bovinos, há algum tempo vem se sugerindo que outras bactérias do gênero *Moraxella* possam estar associadas com a causa de CI (ANGELOS, 2010a, 2010b). Esta suspeita se apoia na incerteza da eficácia da vacina de *M. bovis* (BURNS & O'CONNOR, 2008) e no relato, por parte dos laboratórios de diagnóstico, de isolamento de outro microrganismo das lesões de CI. Por muito tempo a suspeita recaiu sobre *M. ovis* (*M.*

ovis-like, *Branhamella ovis* ou *Branhamella ovis-like*). Contudo, uma nova espécie chamada *Moraxella bovoculi* vem sendo isolada da secreção ocular tanto de bovinos saudáveis quanto de bovinos com CI (ANGELOS et al., 2007a; LIBARDONI et al., 2012; SOSA & ZUNINO, 2013; O'CONNOR et al., 2012).

Embora continuem existindo relatos de doenças em bovinos causadas por *M. ovis* (CATRY et al., 2007), alguns autores sugerem que a vasta maioria dos isolados recuperados de secreções oculares de bovinos com CI, anteriormente identificados como *M. ovis*, agora seriam reclassificados como *M. bovoculi* (O'Connor et al., 2012). No entanto, ainda que as evidências circunstanciais sugiram um papel de *M. bovoculi* na patogênese da doença, a contribuição precisa deste organismo para a CI, seja como patógeno primário, oportunista, ou fator predisponente adicional, ainda não foi estabelecida (ANGELOS et al., 2010a).

O primeiro provável relato desta doença ocorreu em 1889 (BILLINGS, 1889), no qual já foi possível visualizar bacilos na secreção corneal de bovinos. Em 1987, o termo oftalmia contagiosa foi usado subsequentemente ao sucesso da transmissão da doença entre bovinos enfermos e saudáveis. Em 1952, Barner concluiu que a CI era causada por *Moraxella bovis* (PEARCE & MOORE, 2013). Embora outros agentes possam desempenhar alguma função no desenvolvimento da CI, incluindo o herpes vírus bovino 1 (BoHV-1), *Mycoplasma* spp., *Thelazia* spp., *Listeria monocytogenes*, *Moraxella ovis* e mais recentemente descoberta *Moraxella bovoculli* (ANGELOS et al., 2007a; PERACE & MOORE, 2013).

Os sinais clínicos observados nos animais com CI correspondem principalmente a edema e úlceras de córnea, fotofobia, blefarospasmo e lacrimejamento. Ulcerações na córnea associados com *M. bovis* se curam com diferentes graus de cicatrizações da córnea. Cicatrizes graves podem resultar em visão reduzida e nos casos mais graves, nos quais ocorre ruptura da córnea e prolapso da íris, pode resultar em cegueira permanente (CHANDLER et al., 1981; ALEXANDER, 2010).

Pesquisas documentam as perdas econômicas acarretadas pela CI (THRIFT & OVERFIELD, 1974; KILLINGER et al., 1977; SLATTER et al., 1982ab; SIMMS et al., 1993). As perdas financeiras estão relacionadas com redução de ganho de peso, a diminuição na produção de leite e custos com tratamento que foram estimados em US\$150 milhões nos Estados Unidos em 1993 (SIMMS et al., 1993). Em outro estudo a perda por bezerro afetado foi estimada em US\$13 (TROUTT & SCHURIG, 1985).

A perda no ganho de peso pode variar de 8 a 18 Kg (SNOWDER et al., 2005). Perdas econômicas menos tangíveis podem ocorrer, tais como depreciação de valor em remates, perda de peso e injúria dos animais por conta do manuseio no tratamento, condenação no

abatedouro por causa de lesões oculares e perda de produtividade durante o envolvimento com tratamento (PEARCE & MOORE, 2013).

Segundo alguns autores, é a doença ocular que mais frequentemente acomete bovinos em todo o mundo, alcançando altos níveis de morbidade que podem chegar a 80% do rebanho (BAPTISTA, 1979; VAN HALDEREN & HENTON, 2004; POSTMA et al., 2008).

Em um relatório de 1997, da U. S. National Animal Monitoring System, a CI (1,1% de taxa de infecção) foi a segunda condição mais prevalente afetando bezerros não desmamados com mais de três semanas de idade (PEARCE & MOORE, 2013). No mesmo relatório, CI (1,3% taxa de infecção) foi a condição mais prevalente a afetar novilhas e vacas. Nos estudos da Universidade da Califórnia realizados na estação de *Browns valley*, a prevalência anual de CI em bezerros sobreano variou de 57% até 98% (ALLEN et al., 1995; EASTMAN et al., 1998; GEORGE et al., 1988).

Em uma pesquisa postal realizada na Austrália, 81,3% dos participantes relataram a ocorrência de CI em seu estabelecimento rural e 75% observaram perda de ganho de peso nos animais afetados (SLATTER et al., 1982a). Na sequência deste estudo foi estimado um prejuízo de mais de US\$ 22 milhões devido às perdas na produção e US\$ 1,5 milhões com o tratamento (Slatter et al., 1982b).

Esta doença também tem sido diagnosticada na maioria dos estados brasileiros, assim como no Uruguai, na Argentina, no Paraguai e no Chile (GIL-TURNES, 2007). De fato, a CI foi uma das oito doenças estudadas pelo projeto regional cooperativo PROCISUR (Programa de desenvolvimento científico) do Mercosul, hoje Cone Sul, pela Argentina, Brasil e Uruguai (CONCEIÇÃO et al., 2003). No Brasil, tomando somente o Estado do Rio Grande do Sul como objeto de estudo, Baptista e Ribeiro (1974) constataram que à época as regiões com maior ocorrência da doença se localizam no sul e na fronteira do Estado.

A CI é uma doença de portador, estacional com distribuição mundial e, geralmente, com prevalência elevada. A doença afeta animais de todas as idades independente de sexo e raça, ainda que, em estabelecimentos onde é endêmica, as taxas de incidência sejam maiores nos animais jovens (GIL-TURNES, 2007).

M. bovis é tido como um patógeno oportunista que pode ser encontrado tanto nas secreções nasais e da conjuntiva tanto de bovinos sem nenhum sinal clínico ou histórico da doença quanto nos animais que tenham apresentado sinais clínicos da doença, desta forma podem permanecer portadores de *Moraxella* spp. e, por tanto, um reservatório da enfermidade no rebanho (PUGH & MCDONALD, 1986).

Os surtos da doença geralmente ocorrem nas estações mais quentes do ano. Esta sazonalidade foi relacionada a fatores tais como o aumento do fotoperíodo e, conseqüentemente exposição dos animais à radiação da luz ultravioleta (UV), irritação causada por pó, ressecamento da superfície corneal devido ao aumento da velocidade do ar, ação mecânica de pastos, população de moscas da face.

Muitos fatores podem influenciar na patogenese da doença, tais como a estação do ano, irritação mecânica, resposta imune do hospedeiro, patógenos concorrentes, fatores ambientais e as diferenças entre os isolados de *M. bovis* principalmente em relação aos mecanismos de virulência (FRISCH, 1975; WARD & NEILSON, 1979; ALEXANDER, 2010). Embora, a princípio, todas as raças bovinas sejam suscetíveis à infecção, o gado da raça Hereford (*Bos taurus*) tem maior incidência de CI (SNOWDER et al., 2005). Há muito tempo a falta de pigmentação nas pálpebras oculares, que ocorre em algumas raças, tem sido associada com o aumento da incidência de CI (FRISCH, 1975). No trabalho de Snowder et al. (2005) a correlação fenotípica e genotípica entre pigmentação da pálpebra e a incidência de CI foi pequena ou inexistente (SNOWDER et al., 2005). Outro fator colaborador pode ser a menor contribuição antibacteriana da solução lacrimal nas raças Hereford comparadas a outras raças (SNOWDER et al., 2005). No entanto, a significativa maior incidência de CI nos bovinos da raça Hereford em comparação com outras raças ainda não foi verdadeiramente investigada para estabelecer as razões biológicas e fisiológicas para as diferenças de susceptibilidade entre as raças (SNOWDER et al., 2005).

A transmissão do agente patogênico ocorre pelo contato direto, por meio de descargas nasais e oculares e mais comumente por meio da mosca da face (*Musca autumnalis*).

1.1 *Moraxella bovis*

Embora *M. bovoculi* e *M. ovis* já tenham sido identificados no fluido ocular de bovinos saudáveis e com CI (ELAD et al., 1988; ANGELOS et al., 2007a; LIBARDONI et al., 2012; SOSA & ZUNINO, 2013) e expressem genes de virulência semelhantes a *M. bovis* (ANGELOS et al., 2007c; CERNY et al., 2006), ainda não foi possível comprovar a participação destes na etiologia da doença (GOULD et al., 2013). Por tanto, *M. bovis* prossegue sendo considerado o principal agente etiológico da CI desde 1923 quando foi isolado pela primeira vez por Jones e Little, e o único para o qual os postulados de Koch

foram estabelecidos satisfatoriamente para CI (HENSON & GRUMBLES, 1960; ANGELOS et al., 2010a).

M. bovis, bactéria Gram-negativa com formato de cocobacilo (PETTERSSON et al., 1998), apresenta crescimento pobre em ágar e em caldo nutrientes (WATT, 1951). Em meio ágar sangue formam colônias lisas ou rugosas, com 1 a 3 milímetros de diâmetro, circulares e esbranquiçadas com uma zona de beta hemólise que se estende aproximadamente 1mm a partir da borda das colônias (BROWN et al., 1998). Em 48 horas, isolados recentes produzem colônias planas, hemolíticas e friáveis, que podem causar corrosão no ágar e autoaglutinação quando suspensos em salina (VAN HALDEREN & HENTON, 2004). Contudo também existem colônias que não são capazes de corroer o ágar ou se aglutinarem quando suspensas em salina, essa diferença morfológica foi chamada de fase de variação de *M. bovis*, primeiramente descritas por Bøvre & Fraholm (1972). Outra diferença importante entre as cepas de *M. bovis* é a presença ou ausência de hemólise (BROWN et al., 1998).

A fase de variação bacteriana está ligada à produção de pili, apêndice filamentoso que desempenha um papel importante na sobrevivência de espécies patogênicas (MEKALANOS, 1992). Tanto a presença de hemólise quanto a presença de pili estão ligados ao desenvolvimento da CI, pois geralmente cepas não-hemolíticas de *M. bovis* não estão associadas a doença clínica (BROWN et al., 1998) e já foi demonstrado que cepas não-piliadas não são capazes de produzir a doença (JAYAPPA & LEHR, 1986).

Há pelo menos dois mecanismos conhecidos na variação bacteriana. O primeiro mecanismo ocorre em resposta às condições ambientais, tais como alterações na concentração de nutrientes ou alterações na temperatura, assim as bactérias podem se diferenciar pela regulação dos genes (MCMICHAEL, 1992). Esta forma de variação é muitas vezes reversível, e as bactérias que expressam uma ou outra forma são, por vezes, chamadas de variantes de fase. O segundo meio pelo qual as bactérias variam é através de uma reorganização ou modificação da sequência de DNA (MARRS et al., 1985). Parece provável que ambas as formas de diferenciação ocorram em *M. bovis*, e proporcionem a essa espécie considerável flexibilidade para responder aos desafios ambientais (ANGELOS, 2010).

O primeiro mecanismo descrito caracteriza as cepas de *M. bovis* de acordo com a sua distinta morfologia colonial no meio ágar. Colônias com morfologia corrosiva deslizando são chamadas de forma SC (*spreading-corroding*), colônias com morfologia não corrosiva e não deslizando são chamadas de forma N (*non-spreading and non-corroding*), e uma terceira forma, com uma morfologia intermediária, é chamada de forma NSC (BØVRE & FRØHOLM, 1972; MCMICHAEL, 1992). O segundo mecanismo implica na expressão de

moléculas de pilina com sequências alteradas de aminoácidos. As alterações na molécula de pilina são consequência de uma inversão no segmento de DNA onde estão os genes codificadores da pilina. Este mecanismo já foi descrito para cepas de *M. bovis* e *Moraxella lacunata* (MARRS et al., 1985, 1988).

Como regra geral, as formas piliadas e hemolíticas são encontradas nos casos agudos de CI (JAYAPPA & LEHR, 1986) e proporcionalmente os isolados não-piliados e não-hemolíticos são mais recuperados de bovinos convalescentes ou carreadores clinicamente saudáveis (WILCOX, 1970).

Assim, os dois mecanismos patogênicos considerados pré-requisitos para a indução da CI associados a *M. bovis* são a presença de fimbrias (pili tipo IV) que ocasionam a aderência microbiana à superfície da célula do hospedeiro, e a secreção de exotoxina hemolítica (citolítica) com propriedades corneotóxicas e leucotóxicas (GIL-TURNES, 1983; BEARD & MOORE, 1994; ANGELOS et al., 2003).

Outros fatores potencialmente patogênicos incluem proteínas associadas à superfície da membrana externa (*outer membrane proteins* - OMP), filamentos hemaglutinantes (KAKUDA et al. 2006), fosfolipase B (FARN et al., 2001) e lipopolissacarídeo (LPS), a capacidade de se ligar a lactoferrina bovina (*lactoferrin-binding protein* - LBP) e transferrina bovina (*transferrin-binding proteins 1 and 2* (Tbp1 e Tbp2)) como uma fonte de ferro para o crescimento e a expressão de enzimas hidrolíticas e lipolíticas e proteases (YU et al., 2002). Ainda pode ser citada uma variedade de enzimas produzidas por *M. bovis* que, embora seu envolvimento na patogênese não esteja efetivamente comprovado ou ainda não tenha sido estudado em detalhes como a pilina e a citotoxina, podem estar envolvidos no desenvolvimento da CI. Estas incluem uma variedade de enzimas hidrolíticas, incluindo a esterase C4, a esterase-lipase C8, a lipase C14, a fosfoamidase, a fosfatase, as aminopeptidases leucina e valina, a gelatinase e a fibrinolisinase, as quais podem ter participação no desenvolvimento da úlcera corneal (FRANK & GERBER 1981), e um fator solúvel que provoca o desprendimento reversível *in vitro* de células de mamífero (MARRION & RILEY, 2000).

2. Pili (Pili Tipo IV)

Entre os diversos tipos de pili, que foram primeiramente classificados com base na sua morfologia e, mais recentemente, com base em seus mecanismos de montagem, nenhum é tão difundido como pili tipo IV (type four pili - Tfp) (PELICIC, 2008). Os Tfp (também conhecidos como fímbrias) são fibras poliméricas finas, longas e flexíveis montadas a partir de milhares de subunidades proteicas idênticas genericamente referidas como pilina ou Pila. Estas fibras poliméricas são organelas de superfície que ficam ancoradas em feixes laterais na membrana exterior da bactéria.

Os Tfp possuem excepcional multifuncionalidade, dentre as quais se destaca a mediação da aderência às células eucarióticas e da colonização ao hospedeiro. Além disso, estão associados à agregação bacteriana, formação de biofilme, evasão imune, ligação e assimilação de DNA e aos movimentos bacterianos chamados de *gliding motility* e *twitching motility*. Tfp são os únicos pili encontrados tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas, o que, juntamente com o fato de que esta lista está longe de estar completa, sugere que eles são as organelas mais difundidas na aderência bacteriana (PELICIC, 2008).

Estas hastes poliméricas são essenciais para a virulência de várias bactérias Gram-negativas patogênicas e oportunistas. Para muitos patógenos Gram-negativos, a interrupção da montagem do pilus resulta em uma virulência severamente reduzida (BIEBER et al., 1998). Desta forma se destaca a importância crucial dos pili na patogenicidade de uma gama enorme de organismos Gram-negativos, tais como *Moraxella bovis*, *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Burkholderia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter* spp., e mais recentemente *Moraxella bovoculi* (CALCUTT et al., 2014). Assim como a indicação do pilus como alvo importante para o desenvolvimento de vacinas (CRAIG et al., 2004; MATTICK, 2002).

Uma série de características diferenciais dividem estas pilinas em duas classes, denominadas pili tipo IVa (T4aP) e pili tipo IVb (T4bP). As pilinas T4a são uma classe relativamente homogênea encontradas em agentes patogênicos de plantas, animais e humanos, tais como *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* e *Dichelobacter*, bem como nos gêneros ambientais, tais como *Thermus*, *Myxococcus*, *Deinococcus*, *Bdellovibrio*, e *Shewanella* (PELICIC, 2008). A classe T4b é mais diversificada e é mais bem caracterizada por bactérias entéricas, como *Escherichia coli* enteropatogênica, enterohemorrágica e enterotoxigênica, *Salmonella* enterica sorotipo Typhi, e *Vibrio cholerae* (CRAIG et al., 2004).

Ainda assim, as características morfológicas inconfundíveis, que foram inicialmente utilizadas em estudos de microscopia eletrônica para definir Tfp como um tipo específico de pilus ainda são empregados em sua identificação. As características morfológicas de

filamentos flexíveis extremamente finos (5-8 nm de largura), longos (vários micrómetros de comprimento) e que frequentemente interagem formando feixes laterais, são confirmados por ampla evidência molecular como relevantes para a classificação de Tfp de diferentes espécies (CRAIG et al., 2004). Isto porque, apesar da limitada similaridade após os 25-28 primeiros resíduos, todas as subunidades de pilina tipo IV, de certa forma, compartilham uma arquitetura comum: ~53 resíduos do domínio N-terminal formam uma α -hélice estendida, α -1. A metade N-terminal desta hélice, α 1-N, forma o núcleo da fibra do pilus e a metade C-terminal, α 1-C, está incorporado num domínio globular e interage com uma cadeia anti-paralela de quatro a cinco folhas- β ; e as cisteínas conservadas formam uma ligação dissulfeto que liga o segmento C-terminal as folhas- β . Em ambos os lados desta estrutura encontram-se duas regiões que variam substancialmente de pilina para pilina: o $\alpha\beta$ -loop, que se situa entre α 1 e as folhas- β ; e a região-D, englobada pelas cisteínas conservadas (CRAIG et al., 2004) (Figura 1).

A subunidade de pilina (PilA) é expressa como uma pré-pilina contendo uma sequência líder extraordinariamente curta, chamada de peptídeo líder ou sequência sinal (tipo III) seguida pelo subdomínio α 1-N predominantemente hidrófobo (Figura 1) (STROM & LORY, 1993).

As pré-pilinas não estão competentes para a montagem até que o sinal tipo III seja clivado na face citoplasmática da membrana (STROM & LORY, 1991). Assim, durante o processo de secreção, uma peptidase pré-pilina cliva a sequência líder e metila o primeiro aminoácido da proteína madura (STROM & LORY, 1993).

Embora as estruturas 3D de várias pilinas tipo IVa e IVb revelem uma arquitetura conservada consistindo de uma hélice amino-terminal (N-terminal) estendida e uma cabeça globular (carboxi-terminal) (CRAIG et al., 2004), estas duas classes podem ser diferenciadas com base na sequência molecular e comprimento da sequência líder e da proteína madura (CRAIG & LI, 2008). As pilinas tipo IVa têm uma sequência líder mais curta (menos de 10 aa) que as pilinas tipo IVb (~15–30 aa) e uma sequência madura menor (comprimento médio de ~150 aa comparados com uma média de ~190 aa na sequência das pilinas tipo IVb). O primeiro resíduo N-metilado da sequência madura é uma fenilalanina nas pilinas tipo IVa classificadas também como pili MePhe, mas varia na sequência das pilinas tipo IVb (CRAIG et al., 2004).

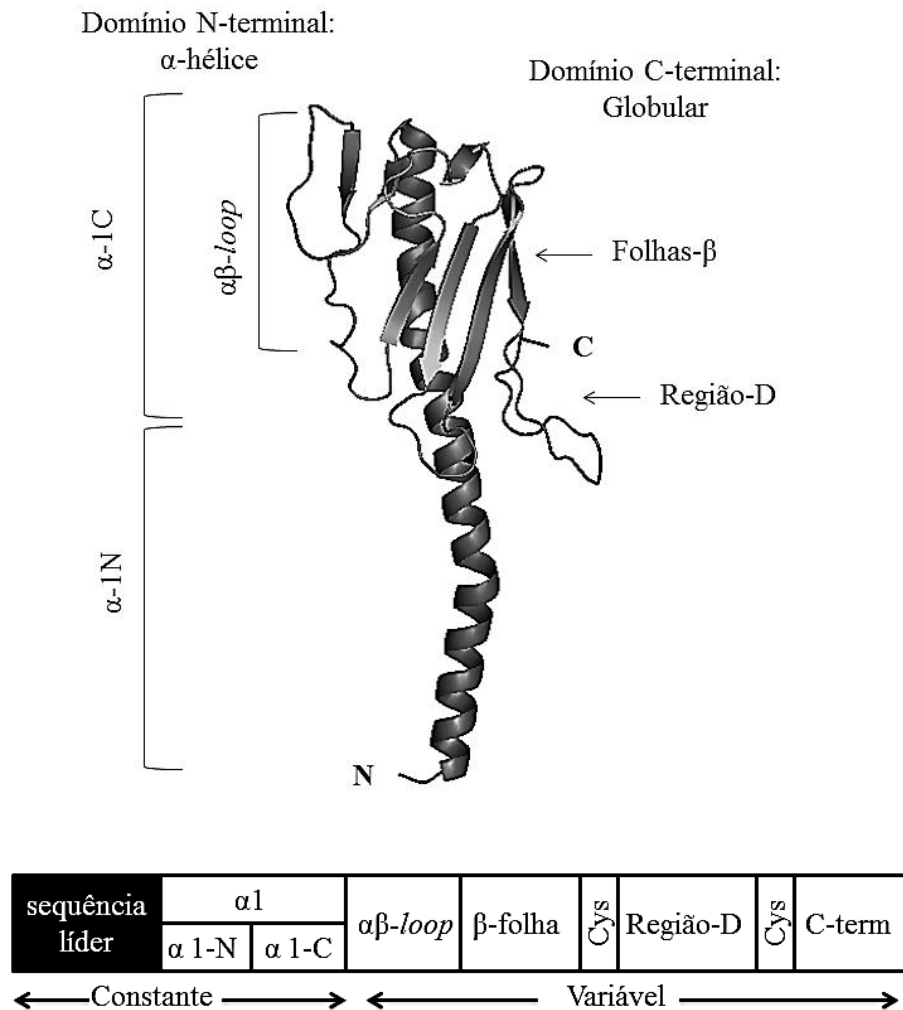


Figura 1 - Estrutura da pilina tipo IV. Domínio N-terminal (constante) compreende a α -hélice, a qual é dividida nos subdomínios, α -1N e α -1C. Domínio C-terminal (variável) compreende o $\alpha\beta$ -loop, as folhas- β e a região-D. A sequência líder (sinal tipo III) está presente apenas na pré-pilina (Fonte: CRAIG et al., 2004; CRAIG & LI, 2008).

Enquanto a robustez da estrutura conservada (α 1-N) mantém as subunidades juntas no filamento, a região central (α 1-C) e a região C-terminal, as quais somam dois terços da proteína, são relativamente hidrófilas, e contêm os principais locais de variação estrutural e antigênica (CRAIG et al., 2004). Esta região da proteína é geralmente estabilizada por uma ou duas pontes dissulfeto (região-D). Esta região compõe a borda externa do domínio globular e provavelmente forma a principal interação entre as subunidades vizinhas, uma vez que na montagem do filamento a região-D de uma pilina se liga à região $\alpha\beta$ -loop da subunidade vizinha. Assim, as regiões $\alpha\beta$ -loop e região-D, estruturalmente variáveis, definem o formato e a interação química da superfície dos pili, sendo importantes para as interações dos pili com

outros pili, com os receptores da célula hospedeira e componentes imunológicos (HAHN, 1997; HAZES et al., 2000).

Os pili tipo IV podem ligar-se a uma variedade de superfícies, incluindo as superfícies inertes, à outras células bacterianas e células eucarióticas, onde podem mediar tanto a colonização da superfície quanto um contato íntimo através da retração do pilus (MERZ & SO, 2000, SUN et al., 2000). O reconhecimento dos receptores nas células do hospedeiro pelos pili proporcionam as denominadas aderência e agregação do agente patógeno ao hospedeiro. Aparentemente os pili parecem ligar-se através da região-D das pilinas à receptores específicos em células epiteliais de mamíferos e de outros tipos de células (MERZ & SO, 2000; HAHN, 1997). Esta aderência entre bactérias patogênicas e oportunistas é pesquisada principalmente nos organismos *P. aeruginosa* e *Neisseria* spp.

Na pilina de *P. aeruginosa* a região C-terminal semi conservada de 12-17 resíduos de aminoácidos (região-D) liga-se à porção de hidrato de carbono dos glicoesfingolípido asialo-GM1 e asialo-GM2 nas células epiteliais (MERZ & SO, 2000, HAZES et al., 2000). Embora a identidade entre o receptor asialo-GM1 e *P. aeruginosa* piliadas tenha sido posta à prova por Emam et al. (2006). A principal pilina de *Neisseria*, Pile, foi reportada como uma hemaglutinante de eritrócitos (SCHEUERPFUG et al., 1999) e por mediar a ligação às proteínas nas células endoteliais do hospedeiro (COUREUIL et al., 2012). O CD46 foi proposto como receptor para o Tfp de *Neisseria* (WEYAND et al. 2006).

A exposição proeminente dos pili de tipo IV na superfície bacteriana os torna alvos óbvios da resposta imune do hospedeiro. As *Neisseria* spp. patogênicas desenvolveram mecanismos fascinantes para evitar o reconhecimento imunológico das suas pili - por exemplo, a variação de fase, a variação antigênica, a modificação pós-traducional e a secreção da S-pilina. A variação de fase é o processo pelo qual a expressão dos pili varia de níveis altos para níveis muito baixos durante o crescimento de *N. gonorrhoeae*, o que pode auxiliar as bactérias a escapar do reconhecimento imunológico após a fase inicial de fixação. Além da variação da expressão, as pilinas podem apresentar uma variação da sequência inter-cepa e intra-cepa, como resultado de uma recombinação homóloga entre a pilina no locus de expressão e os muitos loci silenciosos (HAGBLOM et al., 1985).

Essa variação ocorre em todo o domínio globular e particularmente na alça hipervariável da região-D, o qual sofre mudanças pontuais, bem como deleções e inserções de até quatro resíduos. O efeito destas mudanças é alterar continuamente a antigenicidade da alça hipervariável imunodominante, evitando, assim, uma resposta imune protetora eficaz (HAGBLOM et al., 1985). Além da variação de fase e da variação antigênica, o $\alpha\beta$ -loop da

PilA contém modificações pós-traducionais incomuns, glicosilação e/ou fosforilação. Estas modificações podem mascarar epitopos na PilA e evitar seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro durante a infecção (CRAIG & LI, 2008). A glicosilação da pilina na cepa *N. gonorrhoeae* MS11 foi descrita como uma glicosilação O-ligada dissacarídica (α -D-galactopiranosil-(1/3)-2,4-diacetamido-2,4-didesoxi- β -D-glucopiranosídeo, Gal-DADDGlc). As cepas C311 e 8013 de *N. meningitidis*, são glicosiladas por um trissacarídeo, Gal (β 1 \rightarrow 4) Gal (α 1 \rightarrow 3) 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose, DATDH), enquanto que na cepa de *P. aeruginosa* 1244 um outro tipo de trissacarídeo substituído por grupos N-acetil foi descrito (PARGE et al., 1995; MATTICK, 2002; HORZEMPA et al., 2006;). Finalmente, a secreção da S-pilina também pode funcionar como um desvio para a resposta dos anticorpos anti-pilus (HAAS et al., 1987).

Identificar diferenças funcionalmente significativas de sequência entre as proteínas pili tipo IV é um desafio, uma vez que a relação entre as diversas sequências e estruturas dos pili e sua ampla gama de funções é um dos aspectos mais fascinantes, mas mal compreendidos na biologia dos pili tipo IV. Este enigma persiste, pois enquanto proteínas com sequências amplamente divergentes podem desempenhar as mesmas funções, sugerindo que a variação substancial de sequências pode ser tolerada, em alguns casos até mesmo mudanças individuais de resíduos em proteínas idênticas podem afetar significativamente a função do pilus (AAS et al., 2007; YANG et al., 2011).

Contudo, além das diferenças sequenciais da PilA inter-espécie e consequente influencia na variedade funcional do filamento, há as variações que ocorrem nas sequencias de PilA dentro da mesma espécie.

Esta variação foi mais bem caracterizada no pilus de *D. nodosus*, no qual existem quatro grandes regiões de hipervariabilidade, bem como, outros sítios variáveis que juntos definem os sorogrupos e sorotipos deste microrganismo (MATTICK et al., 1991). A definição de diferentes sorogrupos em uma mesma espécie é geralmente considerada como sendo o resultado da pressão imunitária do hospedeiro. No entanto, vem sendo sugerido, ao menos para alguns patógenos epiteliais, que as razões para as variações dos pili tipo IV podem não estar ligadas à pressão imunitária do hospedeiro e sim a outros fatores. Estes fatores podem ser uma pressão de seleção causada por bacteriófagos pili- específicos, uma adaptação a diferentes ambientes/receptores ou simplesmente uma deriva evolucionária (MATTICK et al., 1991; MATTICK, 2002).

Pilinas tipo IV são altamente imunogênicas e provocam respostas sorológicas de proteção, embora normalmente apenas aos antígenos homólogos ou estreitamente

relacionados (MOORE & LEPPER, 1991; ANGELOS et al., 2007b). Portanto, uma compreensão completa da diversidade entre as pilinas, assim como das regiões conservadas é importante para a concepção de vacinas à base de pilus com ampla proteção (ANGELOS et al., 2007b).

2.1 Pili tipo IVa de *M. bovis*

Os pili tipo IV de *M. bovis* desempenham um papel central na patogênese da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Em *M. bovis*, os pili são filamentos não ramificados alongados compostos de subunidades repetidas individuais de pilin com 6,5-8,5 nm de diâmetro distribuídos ao longo de toda a superfície das células.

A caracterização molecular do pilus de *M. bovis* o identifica como membro da família de pilinas tipo IV, principalmente por conta das semelhanças com membros desta família de pilinas, representados por *Moraxella nonliquefaciens* (FRØHOLM & SLETTEN, 1977), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* (HERMODSON et al., 1978), *Pseudomonas aeruginosa* (SASTRY et al., 1983), *Dichelobacter nodosus*, anteriormente chamado *Bacteroides nodosus* (MCKERN et al., 1983), e *Vibrio cholerae* (TAYLOR et al., 1987). Embora em algumas destas bactérias patogênicas, distintas classes de pili são simultaneamente expressas, *M. bovis* parece ser capaz de produzir apenas pili pertencente à família pili do tipo IVa, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (RUEHL et al., 1988; MATTICK, 2002).

A correlação entre a presença de pili nas células de *M. bovis* e a adesão às células do hospedeiro foi evidenciada ainda em trabalhos da década de 1970 (PEDERSEN, 1973; SIMPSON et al., 1976). Assim, é de conhecimento geral que os Tfp são necessários para a aderência microbiana aos receptores no epitélio da córnea durante o estabelecimento de uma nova infecção (RUEHL et al., 1988).

Além da principal função da pilina de *M. bovis* de aderência à célula epitelial da córnea do hospedeiro (MOORE & RUTTER, 1987; JAYAPPA & LEHR, 1986), esta também tem papel na formação e estabilidade de biofilme, na competência para transformação genética e no movimento independente de flagelo chamado de *twitching motility* (KODJO et al., 1994.; PRIETO et al., 2013; HENRICHSEN et al., 1972). A corrosão do ágar e *twitching motility* são características comuns a bactérias que expressam fímbrias tipo IV (MATTICK et al., 1996). No entanto, durante os processamentos laboratoriais, cepas de *M. bovis* providas de

pili (piliadas, P+) frequentemente interrompem a expressão das pilinas (não piliadas, P-), resultando em colônias com fenótipo liso, ao invés do fenótipo rugoso, e que, portanto, não corroem o agar (MARRS et al., 1985). Com isso, o fenótipo dito piliado de *M. bovis* é a única forma capaz de causar infecção persistente e doença ocular, enquanto a forma não piliada parece ser não patogênica aos bovinos (JAYAPPA & LEHR, 1986).

A importância do pilus na patogenia de *M. bovis* foi demonstrada tanto *in vitro*, com a perda da capacidade de cepas com pili desnaturados de aglutinar hemácias e se aderir ao epitélio da córnea de bovinos (GIL-TURNES, 1983; ANNUAR & WILCOX, 1985), quanto *in vivo* quando cepas piliadas foram capazes de induzir a CI enquanto as cepas não-piliadas não o foram (PEDERSEN et al., 1972; PUGH & HUGHES, 1976). Assim como a antigenicidade dos pili demonstrada com a eficácia das vacinas derivadas de culturas piliadas de *M. bovis* em proteger contra a CIB causada por desafio experimental (JAYAPPA & LEHR, 1986).

Em se tratando especificamente da *Moraxella bovis*, nos anos de 1980 passou-se a considerar que diferentes cepas podiam produzir diferentes tipos de pilina e que uma única cepa era capaz de produzir mais de um tipo de pili tipo IVa. Esta possibilidade foi suscitada com base em estudos que indicaram variações nos pesos moleculares entre as pilinas de diferentes cepas de *M. bovis*, assim como o menor grau de reatividade cruzada entre algumas cepas, por meio de testes sorológicos e falhas na indução de imunidade protetora contra desafios com cepas não homólogas (PUGH & HUGHES, 1976).

Assim, primeiramente cepas de *M. bovis* originárias da Austrália e da América do Norte foram divididas em seis sorogrupos, designados de I a VI, com base na reatividade cruzada pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (LEPPER & HERMANS, 1986). Mais tarde, a relação antigênica de isolados de várias áreas do Reino Unido foi usada para agrupá-los em sete sorogrupos (MOORE & RUTTER, 1987). Em seguida os dois grupos de pesquisa se uniram e agruparam os isolados de *M. bovis* de várias partes do mundo em sete sorogrupos, designados de A até G, com base na variação antigênica dos pili e reatividade cruzada (MOORE & LEPPER, 1991). Neste trabalho também foi sugerido um protocolo padronizado para a sorotipificação de novos isolados com base na relação destes com cepas protótipos de cada sorogrupo (MOORE & LEPPER, 1991).

No entanto, em paralelo à pesquisa sobre a variação antigênica entre os isolados de *M. bovis*, passou-se a pesquisar a possibilidade da expressão de duas fases distintas da pilina pela mesma cepa de *M. bovis*, mas em momentos diferentes. Este fenômeno foi chamado de variação de fase (MARRS et al., 1988).

Na pesquisa de variação de fase da pilina, duas proteínas diferentes de pilina foram identificadas na cepa padrão Epp63 e foram inicialmente chamadas de β -pili e α -pili. Por uma infeliz coincidência dois grupos de estudos deram a mesma denominação às pilinas, porém ao inverso (MARRS et al., 1985; LEPPER & BARTON, 1987; MARRS et al., 1988). Posteriormente estes pesquisadores concordaram em denominar as pilinas β e α respectivamente como Q (*quick*) e I (*intermediate*), nome dado com base na migração das pilinas na electroforese em gel de poliacrilamida (FULKS et al., 1990).

A primeira análise do gene do pilus tipo IV (*tfp*) da cepa Epp63 de *M. bovis* indicou que este codificava uma proteína principiada por seis aminoácidos, provavelmente a sequencia sinal tipo III encontrada no pré-pilin tipo IV, seguida por uma sequência de 151 aminoácidos formadores da proteína madura (MARRS et al., 1985). Em seguida foi verificado que ambos os genes codificadores dos TfpQ e TfpI estavam contidos em uma região de DNA com 2,1 Kilobases (Kb), porém em sentido contrário um em relação ao outro (Figura 2). Assim, foi confirmada a existência de um mecanismo oscilante de rearranjo cromossômico que limita a expressão de um tipo de pilina em benefício do outro tipo, pois apenas um promotor está presente. Este rearranjo ocorre por meio de um evento de inversão da região de DNA de 2,1Kb, determinando qual a proteína pilina será expressa, Q ou I, sendo este processo reversível (MARRS et al. 1988).

Em seguida mais duas fases de leitura aberta foram identificadas próximas aos genes *tfpQ* e *tfpI* e chamadas a princípio de ORF1 e ORF2 (FULKS et al., 1990). Posteriormente a ORF1 foi denominada de gene *tfpB*, cuja função permanece desconhecida, e a ORF2 foi denominado de gene *piv_{mb}*, e provavelmente codifica a invertase responsável pela inversão desta região de DNA (Figura 2). É importante notar que o gene *tfpB* está dentro da região de inversão e provavelmente seja transcrito apenas quando a cadeia de DNA está no sentido da transcrição do gene *tfpQ*. Logo, quando o gene *tfpI* está no locus de expressão, ou o gene *tfpB* não é expresso ou passa a ser transcrito pelo promotor do gene *piv_{mb}*.

Os genes *tfpQ/I* e o gene *piv* de *M. bovis* não são coordenadamente regulados, pois enquanto os genes *tfpQ/I* dependem do promotor σ^{54} para transcrição (codificado por *rpoN* e que requer uma proteína ativadora), o gene *piv* é regulado pelo promotor σ^{70} . Assim, a expressão da Tfp de *M. bovis* é controlada tanto por um sistema específico de inversão do DNA local, que determina qual gene será transcrito (*tfpQ* ou *tfpI*), quanto por um sistema regulador que controla o início da transcrição (HEINRICH & GLASGOW, 1997).

As duas variantes da pilina (Q e I) da cepa Epp63 de *M. bovis* foram testadas para determinar diferenças na patogenicidade da doença. Nestes estudos a variante Q se mostrou

mais efetiva na indução da doença do que a variante I (RUEHL et al. 1993ab). Assim, a TfpQ foi mais importante para a colonização do epitélio da córnea dos bovinos, enquanto a Tfp I foi mais importante para a manutenção da infecção já estabelecida (RUEHL et al. 1993b).

Além da espécie *M. bovis*, até o momento a variação de fase foi apenas verificada nas cepas de *Moraxella lacunata* e a variação antigênica foi mais bem estudada nas cepas de *D. nodosus*, duas espécies conhecidamente patogênicas que causam respectivamente ceratoconjuntivite em humanos e foot rot em ovinos (ROZSA & MARRS, 1991; MATTICK et al., 1991). Além disso, foi recentemente sugerido que o pilus tipo IV de *M. bovis*, como ocorre com muitos pili tipo IV de outras bactérias Gram-negativas, pode ser modificado após a tradução através de glicosilação (BOSCH et al., 2010). A glicosilação pode mascarar epítopos na Pila e evitar seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro durante a infecção (CRAIG & LI, 2008).

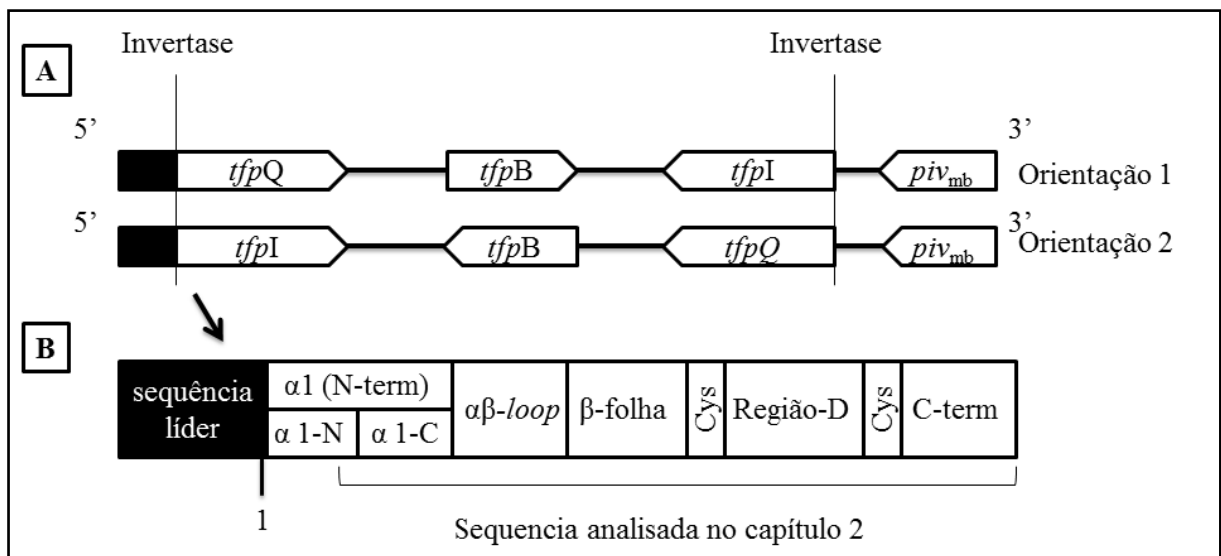


Figura 2 - Representação esquemática da região cromossomal de *M. bovis* na qual ocorre a fase de variação dos pili tipo IV. (A) Representação da região cromossomal de 2,1Kb (delimitada pelas invertases) que sofre a inversão de DNA. As ORFs, assim como a sua orientação estão indicadas pelas setas, as linhas pretas indicam a parte de DNA não codificada. Na orientação 1 o gene *tfpQ* está na direção da expressão, na orientação 2 o gene *tfpI* está na direção da expressão. (B) Conforme o gene *tfpQ/I* que estiver a jusante da sequência líder (que se mantém fixa) será expressa um tipo de pilina. Contudo ambas TfpQ e TfpI apresentam a mesma conformação, com a maior variação entre elas ocorrendo na região C-terminal (Fonte: Fulks et al., 1990).

Deste modo, se for levada em conta a possibilidade de comutação entre duas formas de pilina nos diferentes sorogrupos, provavelmente seja bastante alta a diversidade antigênica

entre as pilinas das cepas desafio de *M. bovis*. Com isso, sugere-se que tanto a variação antigênica, quanto a variação de fase, a regulação da quantidade de pili expresso e a glicosilação pós-traducional podem ser importantes na evasão da resposta imune do hospedeiro por *M. bovis*. Mesmo assim, o Tfp ainda é considerado um importante alvo para o desenvolvimento de vacinas contra CIB e a profilaxia até o momento depende, em grande parte, das vacinas formuladas com células inteiras de *M. bovis* com alta expressão de pili (LEPPER et al., 1995; MCCONNEL & HOUSE, 2005; BOSCH et al., 2010).

Por isso, os estudos envolvendo a proteína pilina de *M. bovis* causaram um impacto na formulação de vacinas contra a CIB. Com o intuito de driblar a pressão de seleção exercida pelos anticorpos circulantes foi sugerida a necessidade da inclusão de pilinas de diversos sorogrupos para confecção de uma vacina polivalente (ATWELL et al., 1994). O mesmo estudo também indicou a possibilidade de uma proteção cruzada com vacinas que venham a incorporar antígenos compostos da extremidade N-terminal da pilina que é altamente conservada entre os sorogrupos (ATWELL et al., 1994). Esta possibilidade foi corroborada com a observação de que pili tratados com brometo de cianogênio provavelmente expõem determinantes antigênicos comuns entre as cepas heterólogas testadas (GREENE et al. 2001a,b).

Outro fator que passou a ser considerado na produção de vacinas para CIB é o nível de expressão de pilina, o qual é subjugado à fase de variação e influenciado por condições ambientais (BØVRE & FRØHOLM, 1972; JAYAPPA & LEHR, 1986; MCMICHAEL, 1992). Os isolados de *M. bovis* são em geral altamente piliados quando crescem em meio sólido enquanto as bactérias cultivadas em meio líquido, método preferencial para produção de vacina, são frequentemente não piliadas (LEPPER et al., 1993). Essa perda dos pili pode ser causada pela fase de variação e/ou pelo estresse hidrodinâmico gerado em culturas agitadas mecanicamente, assim como reportado em outros antígenos bacterianos filamentosos (RODRIGUEZ et al., 1993,1996).

Pesquisas que visam elevar a expressão de pili nas cepas de *M. bovis*, cultivadas em grandes biorreatores para a produção de vacinas, concluíram que o uso de biorreatores tipo coluna de bolhas é preferível em detrimento aos biorreatores agitados mecanicamente, pois reduzem as forças de cisalhamento sobre as células bacterianas (PRIETO et al., 2008). Em adição ao uso de biorreatores de coluna de bolhas, verificou-se que o acréscimo de carboximetilcelulose ao meio de cultura também melhora os níveis de expressão de pili sem alterar as propriedades antigênicas da pilina (PRIETO et al. 2008).

3. Citotoxina (Toxinas RTX)

As toxinas RTX (*repeats in the structural toxin*) constituem uma família continuamente crescente de proteínas com diversas funções biológicas e são assim chamadas por causa de repetições de peptídeos na toxina estrutural (STRATHDEE & LO, 1989).

Estas proteínas RTX são produzidas por uma variedade de bactérias Gram-negativas e apenas exibem duas características comuns. A primeira é a presença de repetições de sequências ricas em glicina-aspartato, tipicamente nonapeptídeos, que estão localizadas na porção C-terminal da proteína. Estes formam numerosos sítios para a ligação de íons Cálcio (Ca^{+2}) e estão na origem do nome histórico da família RTX (WELCH, 2001). A segunda característica fundamental é o modo singular de secreção das proteínas RTX através do sistema de secreção de tipo I (*TISS-type I secretion system*).

A presença de repetições ricas em glicina-aspartato, que é a primeira assinatura característica desta família, apresenta sequências consenso GG-X-G-(N/D)-D-x-(L/I/F)-X (em que X significa qualquer resíduo) perto da extremidade C-terminal das proteínas (LINHARTOVÁ et al., 2010). Cada repetição forma um semi-sítio de uma estrutura cadia- β (β -roll) com o consenso GGxG formando a curva fechada seguida de uma cadeia de folhas- β . Os resíduos hidrofóbicos se estendem para dentro da cadeia- β , criando um interior hidrofóbico. Os íons de cálcio se encontram incorporado nas curvas e estão em contato com o resíduo aspartato conservado na sexta posição das repetições (SATCHELL, 2011).

A secreção da proteína ocorre através de um canal de secreção oligomérico que abrange todo o envelope da célula bacteriana Gram-negativa, ou seja, a membrana citoplasmática, o espaço periplasmático e a membrana externa em uma única etapa.

Este maquinário é composto de três componentes: uma ATPase na membrana interna, uma proteína periplasmática de ligação transmembrana, e uma porina TolC na membrana externa. Estes dispositivos específicos de secreção com base nos transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC) reconhecem o sinal de secreção que neste caso se encontra na parte C-terminal não-clivável da proteína (LINHARTOVÁ et al., 2010). A proteína RTX precisa se desdobrar ou permanecer numa conformação flexível antes da translocação para fora da célula através do TISS (KORONAKIS et al., 2000). A ligação do cálcio às repetições nonapeptídicas na porção C-terminal destas toxinas então aparece para promover a dobragem e impor a

adoção de uma conformação funcional para as proteínas RTX secretadas no ambiente extracelular (ROSE et al., 1995).

Uma vez que todas as proteínas são secretadas como um fio único desdobrado, este tipo de secreção é passível de exportação de proteínas muito grandes (ANDERSEN et al., 2000).

Os genes *rtx* assim como os genes necessários para a secreção estão localizados principalmente dentro de um único grande locus *rtx*.

O operon RTX clássico é composto por quatro genes arranjados 5'-C-A-B-D-3' (Figura 3). O operon RTX melhor caracterizado é o *hly* da *E. coli* uropatogênica, no qual o HlyC ativa a toxina RTX estrutural (HlyA) por meio da acilação do resíduo lisina conservado (STANLEY et al., 1994). A HlyB e a HlyD são requeridas para o transporte extracelular da HlyA (KORONAKIS et al., 1992). Uma proteína acessória de secreção, TolC, é necessária para o transporte da HlyA para fora da célula; o gene *tolC* é desvinculado do operon Hly em *E. coli* (WANDERSMAN & DELEPELAIRE, 1990).

Apesar de uma ampla classe de proteínas RTX compreenderem a secreção de adenilato ciclase, lipases, metaloproteases, bacteriocinas e camadas S (*S-layers*), a palavra 'toxina' é, por razões históricas, incorporada ao nome da família RTX.

Estas toxinas são exoproteínas formadoras de poros produzidas por uma ampla gama de bactérias Gram-negativas patogênicas.

Uma crescente lista de bactérias Gram-negativas de importância veterinária codificam as proteínas citotoxinas RTX, incluindo *Actinobacillus equuli* (BERTHOUD et al., 2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae* (CHANG et al., 1989), *Actinobacillus porcitonillarum* (KUHNERT et al., 2005), *Actinobacillus suis* (BURROWS & LO, 1992), [*Pasteurella*] *mairii* and [*Actinobacillus*] *rossii* (MAYOR et al., 2006), *Mannheimia haemolytica* (LO et al., 1987), *M. bovis* (ANGELOS et al., 2001), [*Pasteurella*] *aerogenes* (KUHNERT et al., 2000), and *Bibersteinia (Pasteurella) trehalosi* (FISHER et al., 1999). Estudos mais recentes também tem relatado a presença de toxinas RTX em *Avibacterium [Haemophilus] paragallinarum* (MENA-ROJAS et al., 2004), *M. ovis* e *M. bovoculi* (ANGELOS et al., 2007c).

As citotoxinas RTX formadoras de poros representam a única classe de proteína bacteriana que compartilham os seguintes mecanismos: (1) Requerem a ativação pós-translacional através de acilação de uma lisina interna por adição de um ácido graxo; (2) possuem um domínio hidrofóbico que foi mostrado ou se presume que formam poros cátion seletivos em membranas celulares alvo; (3) são exportadas (secretadas) por TISSs; (4) quando

da secreção são ativadas para exercer atividade biológica por meio da ligação de íons cálcio dentro das repetições nanopeptídicas ricas em glicina e aspartato.

A ativação pós-traducional é feita pela proteína C (RtxC) que é a ativadora específica para a acilação da lisina e a secreção da toxina fica a cargo das proteínas B e D (RtxB, RtxD) com auxílio da TolC (Figura 3).

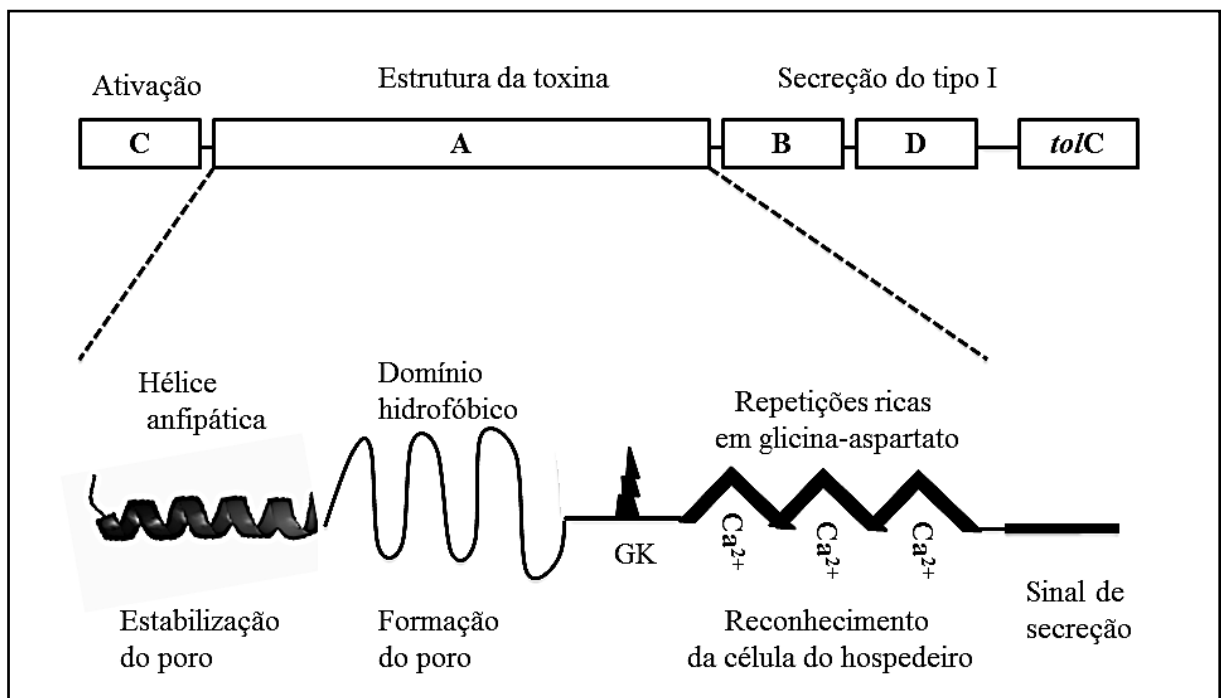


Figura 3 - Operon RTX e estrutura da proteína RtxA. Diagrama superior: representação esquemática de um típico operon RTX : o produto dos quatro genes, C (ativador), A (toxina estrutural), B e D (proteínas de secreção tipo I). O operon RTX é representado por caixas abertas na ordem que geralmente são codificados. Diagrama inferior: representação das principais partes funcionais da toxina. GK indica o local de acilação da lisina-glicina, que é seguido pelo local das repetições ricas em glicina e ácido aspártico (Fonte: FREY, 2011; ANGELOS et al., 2003).

Muitas toxinas RTX são conhecidas como hemolisinas porque lisam eritrócitos *in vitro*, um efeito que é não-específico, mas que serve como um marcador útil na identificação bacteriológica e como um sinal facilmente mensurável *in vitro* em estudos experimentais (FREY, 2011). Deste modo, com base na atividade mais óbvia e/ou primeiro caracterizada historicamente, as toxinas RTX foram divididas em hemolisinas e leucotoxinas (LINHARTOVÁ et al., 2010). As assim chamadas ‘hemolisinas’ RTX inicialmente mostraram exibir limitadas células alvo e especificidade de espécie, enquanto que a atividade

das leucotoxinas era considerada como sendo específica para espécie e tipo de célula (WELCH, 2001). Contudo, embora a atividade hemolítica seja o fenótipo mais evidente de muitas toxinas RTX sob condições *in vitro*, aparentemente os eritrócitos não são os principais alvos destas toxinas (FREY, 2011).

Assim parece adequado assumir que todas as toxinas RTX formadoras de poros são essencialmente leucotoxinas com seletividade para leucócitos sendo, ao menos alguns deles, degradados por uma concentração supra-fisiológica de toxinas. A atividade residual das leucotoxinas (formadoras de poro) mais potentes, com um espectro de hospedeiro menos restrito, iria então ser facilmente detectada como uma atividade citolítica abrangente a uma ampla variedade de tipos de células, incluindo eritrócitos. Em contraste a essas ‘hemolisinas’, as verdadeiras leucotoxinas não teriam qualquer atividade óbvia em outros tipos de célula que não fossem os leucócitos de determinada espécie de hospedeiro (LINHARTOVÁ et al., 2010).

In vivo, as toxinas RTX induzem mediadores inflamatórios ou exercem efeitos citotóxicos e citolíticos principalmente nas células de defesa do sistema imune do hospedeiro, provocando, assim, necrose, apoptose, inflamação e doença (WELCH, 2001). Estes efeitos são resultado da ligação das toxinas RTX à β 2-integrina, por meio da região com repetições ricas em glicina, que provocam necrose e lise celular em altas concentrações ou induzem cascatas de sinalização que conduzem à apoptose em baixas concentrações (DILEEPAN et al., 2007). A ligação específica de várias toxinas RTX para diferentes β 2-integrina foi mostrada para explicar a pronunciada especificidade à célula hospedeira de várias toxinas RTX, um mecanismo que, em conjunto com a adesão específica para superfícies mucosas, parecem determinar a especificidade para hospedeiros dos diferentes patógenos (DILEEPAN et al., 2007).

Em suma, a compreensão dos mecanismos moleculares da toxicidade de toxinas RTX está levando ao desenvolvimento de novas vacinas úteis que já estão no mercado ou que são esperadas para serem introduzidas no futuro, bem como a novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças causadas por uma gama de agentes patogênicos (FREY, 2011).

3.1. Toxina RTX em *Moraxella spp.* de interesse veterinário (MbxA, MbvA e MovA)

A muito os pesquisadores relatam a correlação entre a capacidade de *M. bovis* de produzir β -hemólise em ágar sangue e sua habilidade em produzir doença clínica quando

inoculado em bovinos suscetíveis (PUGH & HUGHES, 1968, 1970) enquanto cepas não hemolíticas não são capazes de causar lesão ocular no gado (BEARD & MOORE, 1994).

No decorrer das pesquisas passaram a observar várias semelhanças entre a atividade da citotoxina de *M. bovis* e a atividade da família de toxinas bacterianas formadoras de poros, as exotoxinas RTX (CLINKENBEARD & THIESSEN, 1991; GRAY et al., 1995; BILLSON et al., 2000). Segundo Clinkenbeard e Thiessen (1991) quando os eritrócitos são expostos à hemolisina (citotoxina) de *M. bovis* ocorrem o efluxo de potássio, o inchaço celular coloidosmótico e a lise. Uma vez que estes efeitos podem ser inibidos com protetores osmóticos, acredita-se que a hemolisina provoca a formação de poros transmembranas nos alvos celulares.

Além disso, bovinos recuperados da CI desenvolvem uma resposta de anticorpo anti-hemolisina (BILLSON et al, 1994) que podem neutralizar a hemolisina de várias cepas de *M. bovis* (OSTLE & ROSENBUSCH, 1985), e bezerros que são vacinados com hemolisina de *M. bovis* estão protegidos contra desafios de cepas heterólogas de *M. bovis* (BILLSON et al., 1994).

Em 2001 Angelos et al. identificaram um gene com sequência homóloga ao de outras toxinas RTX, que foi chamado de *mbxA*. Este gene codifica uma proteína de ~98.8 kDa da citotoxina de *M. bovis*, chamada de MbxA a qual também apresenta sequência de aminoácidos que é característica as toxinas RTX, incluindo as repetições ricas em glicina na região C-terminal.

Este achado foi apoiado pelos testes de neutralização da citotoxina de *M. bovis* por meio do anticorpo monoclonal para a toxina RTX (HlyA) de *E. coli*. Assim como pela neutralização das atividades hemolíticas e citotóxicas por anti-soro de coelho contra a região C-terminal da MbxA (ANGELOS et al., 2001).

Em seguida Hess & Angelos (2006) identificaram e sequenciaram os genes codificadores das proteínas RTX C, B e D que juntos formam o clássico operon RTX (*mbxCABD*). Assim, em *M. bovis*, os genes de operon *mbx* foram designados *mbxC* (proteína de ativação da toxina); *mbxA* (citotoxina estrutural); *mbxB* (transporte); e *mbxD* (transporte) genes. Em adição aos genes RTX identificados em *M. bovis*, uma ORF (*open read frame*) similar a transposases bacterianas foi encontrada a montante do operon *rtx*, a jusante foi identificado o gene *tolC*, codificador da proteína TolC que é necessária para a secreção da toxina RTX.

As diferenças entre as cepas hemolíticas e não hemolíticas encontradas por Hess e Angelos (2006) foram observadas nas regiões flangeadoras do operon RTX e do gene *tolC*.

Enquanto nas cepas hemolíticas o operon RTX estava flanqueado a esquerda e a direita por repetições imperfeitas, as cepas não hemolíticas apresentavam apenas uma repetição ou não estavam flanqueadas por estas repetições.

Ainda, pela forma como está flanqueado, foi sugerido que o operon RTX faz parte de um elemento genético móvel designado como uma ilha de patogenicidade de *M. bovis* (HESS & ANGELOS, 2006). Importante ressaltar que nos isolados de *M. bovis* o gene *tolC* se encontra bem próximo ao operon RTX, o que não ocorre em todas as espécies que possuem o operon RTX.

Clássicos operons RTX completos foram identificados em *M. bovoculi* e *M. ovis*, intimamente ligados, a jusante do gene D, por uma suposta proteína acessório de secreção homóloga a TolC (ANGELOS et al., 2007c). Em *M. bovoculi*, o operon foi designado de operon *mbv*, composto dos genes *mbvCABDtolC*; em *M. ovis* o operon foi designado de operon *mov*, por sua vez composto dos genes *movCABDtolC*.

O anti-soro policlonal de coelho para a região C-terminal da MbvA de *M. bovoculi* neutralizou a atividade hemolítica de *M. bovoculi* e *M. ovis*, mas não neutralizou a atividade hemolítica de *M. bovis*. Por sua vez o anti-soro policlonal de coelho para a região C-terminal da MbxA de *M. bovis* neutralizou apenas parcialmente a atividade hemolítica de *M. bovoculi* e *M. ovis* (ANGELOS et al., 2007c). Angelos et al. (2007c) encontrou ~ 98% de identidade entre as sequências de aminoácido deduzidas da MbvA de *M. bovoculi* e da MovA de *M. ovis*; enquanto a sequência de aminoácido deduzida da MbxA de *M. bovis* foi ~ 83% idêntico as sequências MbvA e MovA.

Deste modo a toxina RTX (citotolisina/hemolisina) secretada por *M. bovis* (MbxA) é implicada na patogenia da ceratoconjuntivite infecciosa bovina (BROWN et al., 1998). Acredita-se que a proteína formadora de poros promova a formação de ulcera corneal por meio da lise das células epiteliais da córnea e dos neutrófilos do hospedeiro (KAGONYERA et al., 1989). A lise dos neutrófilos resulta no vazamento de enzimas degradativas para dentro do estroma da córnea com subsequente fragmentação e agregação de fibras de colágeno nos estágios mais avançados da doença, dificultando a cicatrização da córnea (KAGONYERA et al., 1989).

Embora o receptor de células brancas do sangue ao qual se liga a citotoxina de *M. bovis* não tenha sido relatado, é provável que seja uma integrina $\beta 2$, conforme ocorre para três outras toxinas RTX, α -hemolisina de *E. coli*, leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente chamado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) e leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* (ANGELOS, 2010b).

3.1.1 Citotoxina de *M. bovis* e *M. bovoculi* e vacina

A citotoxina de *M. bovis* se mostrou conservada entre os isolados de *M. bovis* provenientes de diversas áreas dos Estados Unidos (ANGELOS & BALL, 2007a). A aparente conservação da citotoxina de *M. bovis*, assim como a previa comprovação da antigenicidade (GEORGE et al., 2004) e imunogenicidade (GEORGE et al., 2005) encorajaram os testes desta toxina em vacinas recombinantes. A região C-terminal do gene da citotoxina de *M. bovis* (aa 590 até 927) foi a escolhida para este fim (ANGELOS et al., 2004, 2010). A princípio, os bons resultados da vacina recombinante de citotoxina de *M. bovis* sugeriram que a citotoxina de *M. bovis* pode ser uma candidata adequada para o controle da CI em ruminantes (ANGELOS et al., 2004).

Por outro lado, a vacinação com a citotoxina recombinante de *M. bovoculi* aumentou a prevalência de isolamento de *M. bovis* de olhos ulcerados de bezerros em comparação com o grupo controle. Os altos títulos do soro neutralizante para a região C-terminal da MbvA mostrou modular o tipo de cultura dos olhos dos animais afetados em rebanhos onde existem ambos *M. bovoculi* e *M. bovis* (ANGELOS et al., 2010). Em adição, uma vacina recombinante englobando citotoxina e pili de *M. bovis* e citotoxina de *M. bovoculi* com a matriz adjuvante ISCOM (*Immunostimulating complex*) também não mostrou eficiência na prevenção da CI nos bezerros vacinados quando comparados ao grupo controle (ANGELOS et al., 2012).

Em virtude do que foi aqui exposto, essa tese tem como objetivo relatar o estudo filogenético e a análise de sequências de nucleotídeo e aminoácido dos genes da pilina tipo IV (Tfp) de isolados de *M. bovis* e da citotoxina de isolados de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis*. No capítulo 2, são apresentadas análises filogenética e genotípica da região 3' do gene da Tfp de isolados de campo e de cepas vacinais de *M. bovis* oriundos da América do Sul e colhidos entre os anos de 1983 e 2011. No capítulo 3, estão descritas a filogenia e análise genética da região 3' do gene da citotoxina de 17 isolados de *M. bovis*, 11 isolados de *M. bovoculi* e sete isolados de *M. ovis* provenientes de amostras clínicas de ceretoconjuntivite infecciosa em bovinos e ovinos colhidos entre os anos de 1983 e 2013.

CAPÍTULO 2

Phylogenetic and genetic diversity analysis of *Moraxella bovis* type four pilin Q/I genes

Luana D'Avila Farias^a, Agueda Castagna de Vargas^{a*}

(Artigo a ser submetida para publicação – Veterinary Microbiology)

^aSetor de bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 97105-900. *Corresponding author: Tel.: +55 55 3220 8107; fone/fax: +55 3220 8257. E-mail address: agueda.vargas@gmail.com.

Phylogenetic and genetic diversity analysis of *Moraxella bovis* type four pilin Q/I genes

Abstract

Type IV pilus (Tfp) is the main virulence factor of *Moraxella bovis* often required to develop vaccine to prevent infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). As field isolates of *M. bovis* have expressed markedly different antigenic pilus types inter (serogroup A to G) and intra-strain (Q- and I-type pili), continuous survey of antigenic characteristics is necessary. In this study sequences analysis of the 3' region of *tfp* gene of *M. bovis* isolates recovered from IBK outbreaks (n = 16, from 1983 to 2011) and commercial vaccine (n = 5) from Brazil, Argentina and Uruguay, and reference strains (n = 8, including serogroup reference strain) was performed. After PCR amplification, nucleotide (nt 920–1.312) sequencing, and aminoacid (aa) sequence prediction; Q-type (n = 16) and I-type (n = 21) *tfp* sequences, and *tfp* from reference strain (n = 10) were compared, identity levels were calculated, and selective pressure was analyzed. Phylogenetic reconstruction and similarity levels allowed grouping the *tfpQ/I* genes from isolates with seven previously reported prototype serogroups (designed A to G), plus others four groups (Epp, H, I, and J). Among the 31 alleles found, E15 was the most prevalent in the last 20 years. The α -1C N-terminal subdomain and C-terminal domains of *tfp* gene were found as moderate and poorly conserved among the strains, respectively. Molecular evolution analysis revealed a predominantly negative selection at 3' region of *tfp* gene. This result shows that *tfp* COOH-t region is a suitable target for *M. bovis* classification according seven prototype serogroup strains, however discrepancies should be investigated.

Keywords: *Moraxella bovis*, IBK, Pinkeye, type four pili, major pilin, PilA, fimbria

1. Introduction

Moraxella bovis is the main agent of the infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK), the most common and highly contagious ocular disease in cattle worldwide (Brown et al., 1998; Conceição et al., 2003). IBK is considered one of the most economically important diseases in pre-weaned calves (Snowder et al., 2005). In this manner, prevention of *M. bovis* infection with vaccine would be propitious for IBK control. However, multiple commercial *M. bovis* vaccines available nowadays have shown partial protection (Snowder et al., 2005; Burns and O'Connor, 2008). One of the grounds may be assigned by intraspecific diversity of *M. bovis* (Prieto et al., 1999). This has led several authors to investigate the biology of *M. bovis* specially the components of the cell surface such as pili.

Type IV pili (Tfp), included in the type IVa pilin (Tfap) class (Pelicic, 2008), consist of several thousand copies of the protein pilin, which contains an N-terminal α -helix essential for Tfp assembly and a C-terminal globular domain important for its activity. This N-terminal domain can be separated into a highly conserved hydrophobic α 1-N subdomain and a less conserved amphipathic α 1-C subdomain (Craig et al., 2004); while the C-terminal domain is divided into $\alpha\beta$ -loop, β -sheet and D-region, both poorly conserved. These variable and hyper variable regions may be a source of both structural and antigenic inter and intra species variations (Giltner et al., 2012). In some cases even changes of individual residues in identical Tfp may significantly affect its function (Aas et al., 2007).

Type IV pili, apparently the only type of pili produced by *M. bovis*, are responsible for the adherence to eukaryotic cells and host colonization, having a central role in the IBK pathogenesis (Jayappa and Lehr, 1986). Besides the adherence, type IV pili are also implicated in motility, biofilm formation, natural genetic transformation, immune system evasion, and cell signaling to external stimulus (Craig et al., 2004; Mattick, 2002).

Previous studies indicate that *M. bovis* pili have immunogenic and antigenic activity (Jayappa and Lehr, 1986; Moore and Rutter, 1987; Greene et al., 2001) and, therefore, may be recommended for vaccine composition with the aim to prevent IBK. However traditionally, field isolates of *M. bovis* have been subdivided into seven non-cross-reacting serogroups based on antigenic differences among the pili demonstrated with isolates worldwide (Moore and Rutter, 1987; Moore and Lepper, 1991; Conceição et al., 2004). In addition to the serogroup, the inversion of a 2 - kb region of DNA results in two distinct phases of pili expression: I-type (previously the α form) and Q-type (previously the β form) pili (Marrs et al. 1988, Fulks et al., 1990).

Despite the serogroup diversity as well as the epitope conversion, efforts to develop an efficacious vaccine have primarily focused on the use of the pili to stimulate host immunity (McConnel et al., 2005; Burns and O'Connor, 2008). Nowadays, commercially available *M. bovis* vaccines are still composed by whole cell or purified pili of *M. bovis*. Due to this, a continuous epidemiological surveillance worldwide on the prevalent antigenic profile of the outbreaks isolates is recommended to evaluate the coverage vaccination.

To provide more insight about the diversity and the genetic relationship of type four pilin Q and I among *M. bovis* outbreaks isolates, the aim of the present study was to analyze the molecular profile of the α -1C N-terminal subdomain and C-terminal domain (3' region) of *M. bovis* *tfp* gene and compare to vaccine and serogroup reference strains.

2. Materials and methods

2.1. Outbreak isolates, vaccines and serogroup reference strains

Sixteen *Moraxella bovis* strains isolated from outbreaks were used for this study, being fourteen from Brazil and two from Argentina. The fourteen isolates were obtained from several Brazilian provinces between 1983 and 2011. Some isolates had already been partially

characterized by other researchers (Conceição et al., 2004; Libardoni et al., 2012). Strains are described in Table.1.

Differential PCR for 16S-23S intergenic region was performed to distinguish *M. bovis* from *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* (Angelos and Ball, 2007). Genomic DNA was obtained according to Libardoni et al (2012).

Five strains used as commercial vaccine, four from Brazil and 1 from Uruguay, were used for comparison purpose. They were termed PH05, PH06, PH07, PH09, and 2439 (Table 1).

In addition, type IV pili (*tfp*) nucleotide (nt) sequences representing the serogroups A to G, were collected from public database (GenBank[®]) and included in the analysis, as follow: A, S276R (GenBank ID L32968); B, 3W07(L32969); C, Dalton2d (Dal2d) (L32967); D, H358/CS (L32970); E, Tat849 (L32972); F, 218R (L32965); G, Fleur462 (FL462) (L32966) (Atwell et al., 1994), plus the reference strain Epp63 (*tpfQ/I*) (M32345) (Fulks et al., 1990) and Dalton2d (here called Dal2d*) (M92155) (Elleman et al., 1990). The information concerning all isolates and *tfp* gene sequences is shown in Table 1. Type IV pili (*tfp*) nucleotide sequences of *Moraxella nonliquefaciens* (GenBank ID M59707) was used as outgroup for phylogenetic inference.

2.2. PCR amplification

In order to analyze the genetic diversity of *tfp*, isolates identified as *M. bovis* were subjected to PCR based on entire inversion region containing pili structural gene (Fulks et al., 1990). A pair of primer was designed outside the regions of the invertible segment: P1 forward 5`-AACGCTCAAAAAGGTTTCACCC-3` and P2 reverse 5`-CGCCCTTTTGACAAACGCAT-3` (Fig. 1). Amplicons with ~ 2.1 Kb containing the major pili subunits were obtained.

Approximately 50 ng of DNA were used as template in 25 μ L of a mix with 5 μ L of Buffer GoTaq[®] (Promega), 0.4 mM of each primer, 0.6 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) and 1 U of GoTaq[®] DNA polymerase. Amplification was performed using an initial denaturation of 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 50 s, annealing at 67°C for 50 s, and extension at 72°C for 2 min followed by one final extension at 72°C for 7 min. Quality of the amplicon was verified by 1 % agarose gel electrophoresis stained with 1% ethidium bromide (0.5 μ g mL⁻¹).

2.3. Nucleotide sequencing

For nucleotide sequencing, 30–60 ng of PCR product, 4.5 pmol of forward- or reverse-pili primer (described above) were used. Sequencing reactions were performed in duplicates (each product was sequenced twice in both directions) by ACTGene Analises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer AB 3500 Genetic Analyzer armed with 50-cm capillaries and POP7 polymer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA).

2.4. Nucleotide sequences analysis and deduced amino acid sequences

The quality of the DNA sequence was verified by GAP4 program implemented in the Staden Package (Staden, 1996) and the overlapping fragments of each sequence were assembled. The consensus sequence was submitted for comparison with *M. bovis* (strain Epp63; GenBank ID M32345.1 and M59712) *tfpQ* and *tfpI* genes, using NCBI database and BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

As the primers were designed to annealing with regions outside the invertible segment, sequences obtained with primer P1 were considered as in expression direction, whereas sequences obtained with primer P2 were taken as in opposite orientation. According to Fulks

et al (1990), when *tfpQ* is in the expression direction and *tfpI* in opposite orientation it is named orientation 1. When *tfpI* is in the expression direction and *tfpQ* in opposite orientation it is considered orientation 2 (Table1). Thus, the genes *tfpQ* and *tfpI* belonging to the same isolates were used independently for all analysis.

Both assembled consensus 3` region (α -1C N-terminal subdomain + C-terminal domain) from direct and reverse orientation of expression were placed in the same orientation, as well as the reference Epp63, counting a total of 18 *tfpQ* and 23 *tfpI*.

Based on the nt sequences, the aa sequences of the corresponding 3` pili region of each *tfpQ/I* of isolate/strain were translated in reading frame 1 on the direct strand by The Sequence Manipulation Suite software version 2 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>). The aa sequences were submitted to homology comparison using the protein BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The alignments (nt and deduced aa) were performed using Muscle software (Edgar, 2004) using MEGA 6 and edited in BioEdit suite (Fig. 2). Comparisons among aa sequences of α 1-C subdomain and each C-terminal pilin subunits ($\alpha\beta$ -loop, β -sheet and D-region) were conducted, as well as, the identity matrix of D-region (Table 2). In order to facilitate comparison among the various sequences, they were grouped into halotypes/alleles by DnaSP 5.10 software package (DNA sequence polymorphism) (Librado and Rozas, 2009).The identity matrix was obtained by the BioEdit software and SWAAP 1.0.3 software (<http://www.bacteriamuseum.org/SWAAP/SwaapPage.htm>).

The best evolutionary model for nucleotide and amino acid substitution was calculated by MODELTEST software (<http://www.hiv.lanl.gov>) and MEGA 6, respectively.

2.5. Phylogenetic analysis

Phylogenetic reconstruction based on the Maximum Likelihood and Neighbor-joining methods for both nt and aa sequences were conducted in MEGA 6 (Tamura et al., 2013). The

evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method for which the most appropriate method for nt substitution, chosen by Akaike information criterion (AIC), was the General Time Reversible model (Nei and Kumar, 2000) and for aa substitution, chosen by Bayesian Information Criterion (BIC), was WAG model (Whelan and Goldman, 2001). The bootstrap values were calculated using 1000 replicates.

2.6. Selective pressure analysis

In order to determine the main force driving the evolution and the diversification among the *M. bovis* isolates, especially among field isolates and vaccine strains, a selective pressure analysis for the major pili gene was performed using the non-synonymous (dN) and synonymous (dS) substitutions and their distances, based on the Nei–Gojobori method (Nei and Gojobori, 1986). The ratios of non-synonymous to synonymous substitutions (dN/dS) were calculated, as well as the rates of transitions (Ti) and transversions (Tv) based on Kimura 2-Parameter, using the SWAAP 1.0.3 software (<http://www.bacteriamuseum.org/SWAAP/SwaapPage.htm>), Mega 6, SNAP software and DnaSP 5.10 (Librado and Rozas, 2009).

3. Results

3.1. Nucleotide sequences analysis

M. bovis are able to express Q- or I-type genes alternately (Fulks et al., 1990); consequently, two antigenically distinct forms of pili of each organism were sequenced. Unfortunately five sequences of *tfpQ* not achieved enough quality and analysis were conducted with a total of 37 *tfp* genes from *M. bovis* field/vaccine strain (16 *tfpQ* and 21 *tfpI*) and 10 *tfp* genes recovered from public database. Thus 37 *tfpQ/I* genes from 21 *M. bovis*

field/vaccine strains were partially sequenced. The length of the fragments encompassed the coding region α -1C subdomain and COOH-terminus of *tfp* varied from 387 to 414 nt.

The group of *M. bovis* field/vaccine strains had 10 isolates with the *tfp*Q gene in expression orientation and 11 isolates with the *tfp*I gene in expression orientation, , what means orientation 1 and orientation 2, respectively, according to Fulks et al (1990) (Table 1).

All 47 sequences were placed in the same orientation so both Q and I *tfp* genes of each *M. bovis* field/vaccine/reference strain could be aligned. Besides the alignment by Muscle, manual editing was also necessary. For some sites it was hard to define exactly between nt substitution and insertion/deletion.

A consistent alignment provided at the 3` region of *tfp* gene (genome position: nt 920–1.312 of M32345) revealed a range moderate to low degree of similarity among all *M. bovis* field/vaccine/reference strains, confirming this target as a low conserved region.

The nt similarity among the prototype serogroup sequences ranged from 63.9% (between B and C serogroup strains) up to 77.5% (between A and B serogroup strains) (Table 2). Whereas all field/vaccine/reference strains of *M. bovis*, nt similarity ranged from 62.8% to 100%. When domains were compared separately, α -1C N-terminal subdomain resulted in nt identity ranging from 84.4% to 100% and C-terminal domain resulted in Identity ranging from 53.3% to 100% shown to be far less conserved (Table 2 and Fig. 2).

Many nt substitution (averages $T_i = 0.186 \pm 0.016$ and $T_v = 0.177 \pm 0.014$) were observed among 3` region of *M. bovis* *tfp* gene sequences. The T_i/T_v average ratio of 1.096 was observed by analysis of all isolates/strains.

Regarding genetic variability, a total of 31 single haplotypes/alleles were found among the 47 *tfp* gene from 31 *Moraxella bovis* field/vaccine/reference strains analyzed (Table 1).

3.2. Domain sequence analysis

Pili structure consists of an N-terminal α -helix domain followed by a C-terminal globular domain. This N-terminal domain can be further separated into a highly conserved hydrophobic α 1-N subdomain (residues 1–28, without signal peptide) and a less conserved amphipathic α 1-C subdomain (residues 29–53) (Craig et al., 2004). Whilst C-terminal domain consists of three regions, a $\alpha\beta$ -loop followed by an anti-parallel four β -sheet, and a disulfide bond to form the D-region (Craig and Li, 2008). All sequences were analyzed with the Epp63 *M. bovis* strain as standard.

Analysis of predicted protein from α 1-N subdomain sequences included only the last eight residues (residue 21–28), which showed absolute conservation, but synonymous substitutions were observed. Moderate similarity was seen in α -1C subdomain sequences (residue 29–53), with 17 conserved residues. Non-synonymous substitutions yielded aa variation at the residue 33, 35, 36, 37, 43, 46, 47 and 53 (Fig. 2). For the residues 35 and 36 this aa variation was seen only in one sequence. On the other hand, residues 33 and 47 showed aa variation in respectively eight and twelve *tfp* gene sequences. The codon that yielded residue 33 is only under positive selection in α -1C subdomain (Fig. 2).

The C-terminal domain of *tfp* gene of sequences showed insertion/deletion besides synonymous and Non-synonymous substitutions. The length of $\alpha\beta$ -loop region of 31 alleles ranged from 27 to 30 aa (residue 54–81/84) denoting the presence of insertion/deletion. This region had only seven conserved residues in all alleles. The β -sheet region has the first edge more variable than the second one due mainly by the nt insertion/deletion, with the total length ranging from 47 to 51 residues (82/85-130/134). A pair of cysteines at the beginning and the end of the D-region was noted, as seen in all species that have type IVa pili. Besides the pair of cysteine, five other conserved residues keeps a total of 18-20 residues in all sequences analyzed (Fig. 2).

3.3. Phylogenetic inference

Fragments encompassed the coding region of α 1-C N-terminal subdomain and C-terminal domain (3` region) of the pili were used for phylogenetic reconstruction based on the maximum likelihood and neighbor-joining methods for nt (367 positions) and aa (110 positions) sequences which yielded similar distributions. Thus, one method for nt analysis is shown (Fig. 3).

The phylogenetic tree built by maximum likelihood method yielded three major clusters, Cluster I (n = 20), Cluster II (n = 24), and Cluster III (n=2) (Fig. 3). The Clusters I and II were subdivided into five groups each one, whereas cluster III was composed just by one group.

The *tfp* genes of the prototype serogroup strains yielded seven distinct groups which were named according to the serogroup of the reference strains (Groups A to G). At least one field/vaccine strain was clustered in one of the 7 serogroups group. However there are pili sequences that did not fit in these seven groups and yielded four others groups, termed group Epp, H, I, and J.

Not only the prototype sequence of serogroups A to G were grouped separated from each other but all other sequences of *M. bovis tfp* gene collected from public database (Epp63, Dalton 2d*). Group Epp includes *tfpQ* gene from Epp63 strain (reference strain) and four *tfp* sequences from field isolates. Group H includes *tfp* from Dalton 2d* strain and *tfpI* from 85/327, an Argentinian isolate. Group I and J were yielded just by field and vaccine strains. Group I include only *tfpI* gene from PH07 vaccine strain. This PH07 vaccine strain exhibited the largest fragment among the *tfp* genes analyzed, probably by nt insertions.

Thus, the first cluster was comprised by groups A (n = 2), B (n = 3), D (n = 4), Epp (n = 5), and F (n = 6) and the Cluster II was divided into groups C (n = 6), E (n = 9), G (n = 5), I

(n = 1), and J (n = 3). Furthermore group H (n = 2) was clustered completely separate from the others, yielded Cluster III (Fig. 3).

3.4. Similarity levels (among nucleotide (nt) and amino acids (aa) sequences)

The 31 single alleles found among the 47 *tfp* genes were clustered into eleven groups according to phylogenetic relationship and similarity (Identity): Group A (Alleles 1, 2); Group B (3, 4, 5); Group C (6, 7, 8, 9, 10); Group D (11, 12, 13); Group E (14, 15, 16); Group F (17, 18, 19); Group G (20, 21, 22, 23); Group Epp (24, 25, 26); Group H (27, 28); Group I (29); Group J (30, 31), (Table 1 and Fig.3).

Similarity analysis of each of the eleven groups showed some particularities. The nt identity among alleles clustered in the same group ranged from 74% to 99.7%. The groups B, C, D, G, H and J showed the highest nt identity (> 85%). In most cases the identity between the reference strain and field/vaccine strains grouped was lower than the identity among the field/vaccine strains clustered together. This is clearly visible into the groups E and F, in which the field/vaccine strains showed great identity among themselves (> 94.5%), but identity varies between 74% and 79.5% when compared with the corresponding prototype serogroup strain. Nevertheless in group E, both prototype serogroup E and the PH09Q vaccine strain shared the same allele E14.

3.5. Vaccine strains and their relationship with field isolates

In relation to the vaccines samples, three vaccine isolates (2439, PH06 and PH09) showed *tfpQ* gene in expression orientation (orientation 1) and two other (PH05 and PH07) showed *tfpI* in expression orientation (orientation 2). The *tfpQ* genes of the ancient vaccine strain 2439, from Uruguay, as well as, of the currently vaccine isolates PH06 and PH09, were clustered into groups B, D, and E respectively as shown in figure 3. The *tfpI* gene from

currently vaccine isolate PH05 was clustered into group F while the same gene of PH07 not achieved enough similarity with any group being clustered alone in group I. The reverse orientation of the genes from currently vaccine isolates were clustered mainly in group C (Fig. 3). There are no alleles of vaccine strains within six groups (A, B, Epp, G, J, H). Most field strains were included into group E (Allele E15, $n = 6$) followed by group Epp ($n = 4$) and G ($n = 4$).

Similarity of the deduced aa of C-terminal sequences and D-region sequences of *M. bovis tfp* gene among vaccine and field strains are shown in Table 2. For the C-terminal sequence, allele E15 showed 73% of similarity with *tfpQ* gene of the PH09 vaccine strain (orientation 1), whereas for D-region, allele E15 showed 60% of similarity. In addition, *tfpI* gene from PH05 has 100% of similarity with two field strains; while the *tfpQ* gene from PH06 has 100% with other two field strains.

All *tfp* genes from field/vaccine strains clustered in group C are in inversion expression. In relation to field strains with low similarity (from 39 to 65%) to vaccine, it is possible to find sequences of the strains isolated before 1993 clustered in group B, Epp, H and J while the most recent field strains (after 1995) were clustered in group A, Epp and G (similarity from 46 to 70%). Thus, in group Epp there are allele from ancient field strains (Epp25) and allele from most recent field strains (Epp26).

3.6. Selective pressure analysis

Calculation of dN/dS ratio based on the number of synonymous ($dS = 0.447 \pm 0.027$) and non-synonymous ($dN = 0.226 \pm 0.021$) substitutions in the *tfpQ/I* sequences was performed. From the hypothesis tested for the evolution of *M. bovis tfpQ/I* 3' region, the average ratio (dN/dS) was 0.505. Thus, in most cases the alternative hypothesis for purifying or negative selection was accepted (H_a $dN < dS$). At least 75% of coding sequences analyzed

had dN/dS ratios <0.75 , suggesting that most isolates are under purifying selection. Indeed 46 comparisons yielded dN/dS ratios <0.2 , mainly involving comparison among field/reference strains of Group E (alleles E15 and E16) and Group D (alleles D10, D11, D12 and D13).

Despite the sequences are under purifying selection there are some codons under positive selection. Only one codon under positive selection ($dN>dS$) is found in α 1-C N-terminal subdomain. However, it is estimated there are 15 codons under positive selection in C-terminal domain of *tfpQ/I* gene. The codons under positive selection are distributed as follows: 3 codons in $\alpha\beta$ -loop region, 8 in β -sheet, 3 in D-region, and 1 in the end C terminus.

When 3' region *tfp* sequence of the field/vaccine/reference strains were compared with each other it is clear that positive selection also plays a role in evolution mainly between field strains from Uruguay and Argentina (alleles B4 and B5, respectively) and field strains from group C (alleles C9 and C10). Incredibly positive selection also occurred between *tfpQ* and *tfpI* genes of the same field strain (2439 from Uruguay).

The highest average rates of Ti and Tv were observed between groups G and Epp and groups H and I. When rates of nt substitutions for all codon positions were performed, a balance between nucleotide substitutions by transition and transversion was observed. Codons under positive selection show greater degree of substitution by transversion. It is observed at C-terminal region with changes between polar (acidic, basic, neutral) and nonpolar aa, whilst at α -1C N-terminal subdomain such exchanges involve mainly silent substitutions (nt 1004 to 1011), but changes occur only at single codon under positive selection and nt 978 to 984. It involves changes between aa with polar characteristic (hydrophilic) by another with nonpolar trait (hydrophobic) or vice versa.

4. Discussion

Type IV pili protein (Tfp) of *M. bovis* is a virulence factor *sine qua non* to cause IBK (Brown et al., 1998) and has ability to incite protective serological responses only for homologous or closely related antigens (Lepper et al., 1992; Angelos et al., 2007). Thus α -1C N-terminal subdomain and C-terminal domains of *tfp* gene, moderately and poorly conserved respectively (Atwell et al., 1994), were chosen to evaluating the relationship among *M. bovis* isolates obtained from clinical specimens and vaccine strains from Brazil, Uruguay and Argentina (1983–2011), and the sequences of different serogroups collected from public database.

In general the sequences of 3` region of *tfp* gene revealed a low degree of nt and aa similarity among the field/vaccine/reference strains clustered in different groups. All prototypes strains of the seven serogroups sequences were able to yield a phylogenetic group separately what ratifies antigenic differences among *M. bovis* pili as reported by Moore and Rutter (1987) and Moore and Lepper (1991) using serological tests. On the other hand, eight *tfp* sequences were grouped separately from known prototypes strains including *tfp* sequences from public database (Epp63Q and Dal2d*). These isolates yielded groups: Epp, H, I, and J. Phylogenetic tree showed a clear segregation of groups into two main clusters and another smaller cluster containing only the group H. The first main cluster showed close relationship among groups A, B, D, F, and Epp. The second main cluster was compound by groups C, E, G, I and J (Figs. 2 and 3).

The sequence diversity described here for *M. bovis* has been also observed in Tfp of *Dichelobacter nodosus*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Pseudomonas aeruginosa*, species which Tfp have been intensively studied (reviewed in Craig et al., 2004). Mattick et al (1991) have correlated the C-terminal Tfp predicted aa sequences of *D. nodosus* with the results of immunological cross-reaction studies and observed that serogroups are characterized by 30 to 45% of variability at this region. The Tfp C-terminal variability of the seven prototypes

strains of *M. bovis* range between 33.7 and 53.2%, while among all groups ranged from 29.9 to 61% (Tab. 2). The lower variability occurred mainly between groups G and C. The sequences clustered in groups with lower variability (< 35%) were not observed in the same *M. bovis* strain.

The variability of C-terminal Tfp sequences into groups ranged between 0 and 32.9%. The highest rates of variability were observed between components of the groups F and Epp. In fact, the variability between field/vaccine strains and reference strains exceeded the variability observed among different serogroups. Interestingly, despite Epp63 strain did not cluster with no one serogroup reference here, it was included in the serogroup F by Moore and Lepper (1991). Although there is great variability among the alleles that comprise the groups F and Epp, there was no consistent similarity of these sequences with other groups, the same also happened with the PH07 vaccine strain (allele 29) that alone yielded the group I. One factor that complicates the grouping of Tfp sequences, mentioned by Mattick et al. (1991) between Tfp sequences of *D. nodosus*, is the kind of variations observed among *M. bovis* TfpQ/I sequences that involving similar amino acids and/or amino acids which are present in the equivalent position in strains in other serogroups. Namely depending on which region of the Tfp protein is being compared ($\alpha\beta$ -loop, β -sheet or D-region) a group may be more similar to one or another group. These variations on common themes can be viewed among *M. bovis* Tfp sequences (Fig. 2).

Throughout the 3' region of *tfp* gene there is an excess of synonymous and non-synonymous substitutions. Despite some codon sites in *tfp* sequences are under positive selection, in most cases we can infer that purifying selection is involved on the differentiation among the eleven groups. A large number of functions carried out by Tfp may explain the paradox forces involved in its evolution. Thus, if on one hand it needs to have molecular variation to escape the host immune system (Greene et al., 2001; Biais et al., 2009) and

infective bacteriophage (Chung et al., 2014), on the other hand, they need to maintain certain amount of conservation in order to ensure the functionality of Tfp (Craig and Li, 2008). For pathogenic bacteria, the region-D of the Tfp is responsible for the adhesion of both host cells receptors and phage involved in exogenous DNA uptake (Giltner et al., 2006; Craig, 2004).

Thus, maybe the region-D could infer more accurately the correlation between Tfp sequences and results of immunological cross-reactions. Comparisons among D-region of *M. bovis* Tfp sequences into each group showed similarity greater than 80% in most part. Exceptions occurred in groups Epp and E. Epp63Q strain (Epp24) showed greater similarity with strains of group D (80%), while field strains from group Epp (alleles 25 and 26) were greater similarity with group H (84%), but also with groups B, C, D e F (Tab. 2). The similarity in D-region between Epp63Q strain and alleles Epp25 and 26 was 63%. The similarity in D-region between Epp63 strain and 218R strain (serogroupo F), serogroup which Epp63 strain was included by Moore e Lepper (1991), was just 55%.

More complex situation occurs with Tfp sequences clustered in group E. The similarity of D-region subunit between field strains and reference strain is just 60%, while similarity of entire C-terminal is 73%. However field strains (alleles 15 and 16) reach the highest similarity with H358/CS strain (serogroup D) (65%). It is important to note that the allele E15 comprises the largest number of field strains from outbreaks of IBK in different times (years) and places (farms) in South America. Therefore if the D-region is really the antigenic/immunogenic subunit of *M. bovis* Tfp protein, the vaccine strain (allele E14) would not be able to protect against challenge with allele E15, even both having great similarity in the rest of the Tfp sequence.

Beyond D-region, $\alpha\beta$ -loop subunit also is exposed at pilus surface, forming with D-region an interface for subunit–subunit interactions in the assembled pilus filament (Craig, 2004). Post-translational modifications such as glycosylation and phosphorylation, are

reported in this region (Craig, 2004; Craig and Li, 2008). Bosch et al. (2010) suggested that the *M. bovis* Tfp probably undergoes post-translational modification by glycosylation. In others pathogenic bacteria the glycosylation usually occurs in a serine at position 63, in $\alpha\beta$ -loop region (Parge et al., 1995). Among the analyzed sequences, a serine was found exactly at position 63, but only on groups that are part of the cluster II (Fig. 2). The phosphorylation of serine at position 68 typically occurs in Tfp of some pathogenic bacteria; in this exact position a glutamate appears conserved in all sequences of *M. bovis* Tfp, suggesting involvement in important function of the protein.

The relative limited world-wide pilus antigen variability was seen among South America strains (Conceição et al, 2004) as well as among Australian, British, New Zealand, and North American strains (Moore and Lepper, 1991). The limited pilus variability was also verified in this survey since sequences *tfpQ/I* of field strains from South America and prototype serogroup strains from Australia were clustered together in most cases with high identity. Furthermore it was shown that sequences surveyed in this study were under negative or purifying selection and relatively stable over years as well as reported by Moore and Lepper (1991) and McConnel et al. (2008). In most outbreaks of IBK in the last 20 years in southern Brazil, most *tfp* sequences from *M. bovis* isolates showed the same allele E15.

Most of *tfp* sequences in expression orientation of the strains from southern Brazil, collected in the last 20 years, are grouped along with group E (n=4) and G (n=3) as I-type, and group D as Q-type. Although only one strain from South America comprises group A, this has a lot of importance because it was recovered from current outbreak (2011). No one isolate from Brazil were clustered in the groups B and H. However, strains from Uruguay and Argentina collected in the 1980s showed sufficient identity with the prototype 3W07 (serogroup B) and D2d* (group H). Failure to find current outbreak isolates in Group B can be explained in part by the fact that the isolate 2439 is an ancient vaccine strain widely used

since the 1980s in South America which suggests a selection process with the disappearance of this serogroup.

Sequence in expression orientation from current vaccine strains was clustered in groups D, E, F, and I. Consequently, considering the outbreak strains in the last 20 years and that only the strains clustered with the vaccine strain would be controlled by vaccination, vaccine would be failure to members of the groups C, G, A and Epp. However, we previously showed low similarity of *tfp* sequence, mainly in the region-D, between the vaccine strain (E14) and field strains (E15) clustered in group E. In this case the vaccine strain could fail to protect against challenge with field strains clustered in the same group.

This study has shown a great, but relatively limited, antigenic variation among the samples of IBK outbreaks since most of them has achieved high similarity with the seven prototype serogroups strains as demonstrated by other authors (Gil-Turnes and Albuquerque, 1984; Lepper and Hermans, 1986). In addition, it was possible to find isolates from the same outbreak with different molecular profile (SB28/11_{2g} and SB28/11_{9p}) The SB28/11_{2g}I sequence was clustered in group G and the SB28/11_{9p}I sequence in group F, while inverse sequences were corresponded respectively to groups E and A. On the other hand, different outbreaks of IBK at different times showed strains having the similar molecular profile both I- and Q-type *tfp* genes (SB24/90 and SB234/93; PH06 and PH10; PH08 and Torres; SB548/99 and SB28/11_{2g} (Table 1).

The absence of an agreement about the commercially available *M. bovis* vaccines efficacy may rely on the antigenic and phase variation of the type IV pili. Probably the antigenic variation and phase variation are important reasons for which most commercial bacterin containing pilated strains of *M. bovis* or purified pili are available with no consensus on vaccine efficacy (Burns and O'Connor, 2008). Since the prominent exposure of the type IV pili on bacterial surfaces make pili obvious targets for the host immune response, both

inter-strain and intra-strain pilin sequence variation need to be monitored. Likewise it is necessary periodic epidemiological investigation of *M. bovis* prevalent serogroups, would also be interesting to develop more accurate and easily reproducible techniques to be employed in this purpose.

Although the serum tests are considered the gold standard for antigenic characterization of Tfp would be interesting to infer the cross-reactivity among the strains of *M. bovis* through simple analysis of the protein pilin sequence. Molecular analysis could redress disadvantages observed in serological tests, such as the limitation or termination of transcription of the *tfp* gene, reported in liquid medium (Burns and O'Connor, 2008; Bosch et al., 2010). Genetic analysis further provides more accurate knowledge of both the antigenic and the phase variation, since it allows foreseeing the sequence in the opposite sense which may again become expressed (Ruehl, 1993ab).

Despite sequence profile analysis of the Tfp are not yet able to infer about the level of cross-reaction among isolates, it showed an ability to classify most of the field and vaccine strains in different antigenic serogroups by the relationship with Tfp of prototype strains, through phylogeny and identity level. However, further work can be carried out in order to define the correlation between sequence and antigenicity of Tfp of *M. bovis* strains, particularly sequences that were not clustered with the prototype serogroups strains.

5. Conclusion

The sequencing and phylogenetic analysis of the 3' region of the *tfp*Q/I gene of *M. bovis* isolates/strains allowed molecular differentiation and phylogenetic classification in eleven groups. This result shows that *tfp* COOH-t region is a suitable target for *M. bovis* classification according seven prototype serogroup strains known until now, even with some

discrepancies. Thus genetic grouping based on this region has probably a genetic value related to selective pressure despite has not been proven the biological significance of these results.

References

- Aas, F.E., Winther-Larsen, H.C., Wolfgang, M., Frye, S., Løvold, C., Roos, N. van Putten, J.P.M., Koomey, M., 2007. Substitutions in the N-terminal alpha helical spine of *Neisseria gonorrhoeae* pilin affect Type IV pilus assembly, dynamics and associated functions. *Mol. Microbiol.* 63, 69-85.
- Angelos, J.A., Ball, L.M., 2007. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other *Moraxella* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 532-534.
- Angelos, J.A., Bonifacio, R.G., Ball, L.M., Hess, J.F., 2007. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin-*Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vet. Microbiol.* 125, 274-283.
- Atwell, J.L., Tennent, J.M., Lepper, A.W., Elleman, T.C., 1994. Characterization of pilin genes from seven serologically defined prototype strains of *Moraxella bovis*. *J. Bacteriol.* 176, 4875-4882.
- Biais, N., Higashi, D.L., Brujić, J., So, M., Sheetz, M.P., 2010. Force-dependent polymorphism in type IV pili reveals hidden epitopes. *PNAS*, 107, 11358-11363.
- Bosch, A., Prieto, C., Serra, D.O., Martina, P., Stämmeler, M., Naumann, D., Schmitt, J., Yantorno, O., 2010. Type-IV pili spectroscopic markers: Applications in the quantification of piliation levels in *Moraxella bovis* cells by a FT-IR ANN-based model. *J. Biophoton.* 3, 522-533.
- Brown, M.H., Brightman, A.H., Fenwick, B.W., Rider, M.A., 1998. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 259-266.

- Burns, M.J., O'Connor, A.M., 2008. 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*.26, 144-152.
- Chung, I.Y., Jang, H.J., Bae, H.W., Cho, Y.H., 2014. A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly. *PNAS*. 111, 11503-11508.
- Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., Paolicchi, F., Cobo, A.L., Gil-Turnes, C., 2004. Molecular diversity of *Moraxella bovis* isolated from Brazil, Argentina and Uruguay over a period of three decades. *Vet. J.*, 167, 53-58.
- Craig, L., Li, J., 2008. Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. in Struct. Biol.* 18, 267-277.
- Craig, L., Pique, M.E., Tainer, J.A., 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2, 363-378.
- Elleman, T.C., Hoyne, P.A., Lepper, A.W., 1990. Characterization of the pilin gene of *Moraxella bovis* Dalton 2d and expression of pili from *M. bovis* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 58, 1678-1684.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Fulks, K.A., Marrs, C.F., Stevens, S.P., Green, M.R., 1990. Sequence analysis of the inversion region containing the pilin genes of *Moraxella bovis*. *J. Bacteriol.* 172, 310-316.
- Giltner, C.L., Nguyen, Y., Burrows, L.L., 2012. Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 740-772.
- Giltner, C.L., van Schaik, E.J., Audette, G.F., Kao, D., Hodges, R.S., Hassett, D.J., Irvin, R.T., 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain

- functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol. Microbiol.* 59,1083-1096.
- Gil-Turnes, C., Albuquerque, I.M., 1984. Serotypes and antibiotic sensitivity of *Moraxella bovis* isolated from an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Can J Comp Med.* 48, 428-430.
- Greene, W.H., Grubbs, S.T., Potgieter, L.N. 2001. Immunoblot analysis of cyanogen bromide-cleaved *Moraxella bovis* pilin reveals presence of shared antigenic determinants on pili from heterologous strains. *Vet. Microbiol.* 80, 365-372.
- Jayappa, H.G., Lehr, C., 1986. Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of *Moraxella bovis* in calves. *Am. J. Vet. Res.* 47, 2217-2221.
- Lepper, A.W., Hermans, L.R., 1986. Characterisation and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. *Aust Vet J.* 63, 401-405.
- Lepper, A.W.D., Moore, L.J., Atwell J.L., Tennent , J.M., 1992. The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. Microbiol.*, 32, 177-187.
- Libardoni, F., Scherer, C.F.C., Farias, L., Vielmo, A., Balzan, C., Vargas A.C., 2012. *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 743-746. (in Portuguese, with English abstract).
- Librado, P., Rozas J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451-1452.
- Marrs, C.F., Ruehl, W.W., Schoolnik, G.K., Falkow, S., 1988. Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. *J. Bacteriol.* 170, 3032-3039.
- Mattick, J.S., Anderson, B.J., Cox, P.T., Dalrymple, B.P., Bills, M.M., Hobbs, M., Egerton, J.R., 1991. Gene sequences and comparison of the fimbrial subunits representative of

- Bacteroides nodosus* serotypes A to I: class I and class II strains. *Mol. Microbiol.* 5, 561-573.
- Mattick, J.S., 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 289-314.
- McConnel, C.S., Shum, L., Gleeson, B.L., HOUSE, J.K., 2008. Serologic cross-reactivity of Australian *Moraxella bovis* to vaccinal bacterin strains as determined by competitive ELISA. *Aust Vet J.* 86, 124-129.
- McConnel, C.S., Shum, L., House, J.K., 2005. Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccine development. *Aust Vet J.* 83, 506-510.
- Moore, L.J., Lepper, A.W., 1991. A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. *Vet Microbiol.* 29, 75-83.
- Moore, L.J., Rutter, J.M., 1987. Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 25, 2063-2070.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418-426.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333p.
- Parge, H.E., Forest, K.T., Hickey, M.J., Christensen, D.A., Getzoff, E.D., Tainer, J.A., 1995. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6Å resolution. *Nature.* 378, 32-38.
- Pellicic, V., 2008. Type IV pili: e pluribus unum? *Mol. Microbiol.* 68, 827-837.
- Prieto, C.I., Aguilar, M.O., Yantorno, O.M., 1999. Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. *Vet. Microbiol.* 70, 213-223.
- Ruehl, W.W., Marrs, C., Beard, M.K., Shokooki, V., Hinojoza, J.R., Banks, S., Bieber, D., Mattick, J.S., 1993a. Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas in vitro. *Mol. Microbiol.* 7, 285-288.

- Ruehl, W.W., Marrs, C.F., George, L., Banks, S. J., Schoolnik, G.K., 1993b. Infection rates, disease frequency, pilin gene rearrangement, and pilin expression in calves inoculated with *Moraxella bovis* pilin-specific isogenic variants. *Am. J. Vet. Res.* 54, 248-253.
- Snowder, G.D., van Vleck, L.D., Cundiff, L.V., Bennett, G.L., 2005. Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves. *J Anim Sci* 83, 507-518.
- Staden, R., 1996. The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 1596-1599.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Whelan, S., Goldman, N., 2001. A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Mol. Biol. Evol.* 18, 691-699.

Table 1. *Moraxella bovis* isolated from Brazil (BR), Uruguay (UY) and Argentina (AR) and reference strains included in the present study

<i>M. bovis</i>	Tfp (Q/I) ^a	Subgroup (letter) and Allele (number) ^b		Orientation (1 or 2) ^c	Country/state	Year	GenBank ID or publication
		Q	I				
Epp63	Q/I	Epp24	E16	1	US	(-)	M32345 M59712
S276R (A)	(-)	A1		(-)	AU	(-)	L32968
3W07 (B)	(-)	B3		(-)	AU	(-)	L32969
Dal2d (C)	(-)	C6		(-)	AU	(-)	L32967
H358/CS (D)	(-)	D11		(-)	AU	(-)	L32970
Tat849 (E)	(-)	E14		(-)	AU	(-)	L32972
218R (F)	(-)	F17		(-)	AU	(-)	L32965
FL462 (G)	(-)	G20		(-)	AU	(-)	L32966
Dal2d*	(-)	H28		(-)	AU	(-)	M92155
2439 (V)	Q/I	B4	C9	1	UY	1983	Conceição et al., 2004
85/327	Q/I	B5	H27	1	AR	1985	Conceição et al., 2004
SB24/90	Q/I	J31	Epp25	1	BR/RS	1990	Libardoni et al., 2012
SB234/93	Q/I	J30	Epp25	2	BR/RS	1993	Libardoni et al., 2012
PH02	Q/I	G21	J31	1	BR/RS	1995	(-)
PH04	Q/I	D12	C10	1	BR/RS	1996	(-)
PH05 (V)	I	(-)	F19	2	BR/RS	1996	(-)
PH06 (V)	Q/I	D13	F19	1	BR/RS	1997	(-)
PH07 (V)	Q/I	C9	I29	2	BR/RS	1998	(-)
PH08	Q/I	Epp26	C7	1	BR/RS	1998	(-)
PH09 (V)	Q/I	E14	C8	1	BR/RS	1999	(-)
SB548/99	Q/I	E15	G21	2	BR/RS	1999	Libardoni et al., 2012
147	Q/I	F18	G22	2	AR	1999	Conceição et al., 2004
Torres	Q/I	Epp26	C7	1	BR/RS	2000	Conceição et al., 2004
PH10	Q/I	D12	F19	1	BR/RS	2000	(-)
SB151/01	I	(-)	E15	2	BR/RS	2001	Libardoni et al., 2012
SB111/02	I	(-)	E15	2	BR/RS	2002	Libardoni et al., 2012
SB246/04	I	(-)	E15	2	BR/RS	2004	Libardoni et al., 2012
SB21/08	I	(-)	E15	2	BR/RS	2008	Libardoni et al., 2012
SB28/11 _(2g)	Q/I	E15	G23	2	BR/RS	2011	Libardoni et al., 2012
SB28/11 _(9p)	Q/I	A2	F19	1	BR/RS	2011	Libardoni et al., 2012

(V) strain used in commercial vaccina; (-) no information; Serogroup assignments are shown in parentheses after strain designations.

^a tfp (Q/I) type four pili Q or I.

^b Alleles (n = 31) were grouped according to phylogeny and identity (%) among strains. Group/allele in expressed orientation are in bold.

^cOrientation 1 (Q pilin expressed); orientation 2 (I pilin expressed) (Fulks et al., 1990).

US United States of America; Brazilian states: RS, Rio Grande do Sul; Au Australia

Table 2. Similarity levels among the deduced amino acids (aa) sequences of the 3' region of type IV pili gene of *Moraxella bovis* field/vaccine isolates and reference strains divided in 31 alleles into 11 groups.

C-Terminal ^a		Amino acid Identity (%)																														
D-Region ^a	A1	A2	B3	B4/5	C6	C7	C8	C9/10	D11/12/13	E14	E15/16	F17	F18	F19	G20	G21	G22	G23	Epp24	Epp25	Epp26	H27	H28	I29	J30	J31						
A1	100	74	66	65	50	50	51	52	63	59	57	63	63	62	58	57	56	58	66	58	57	52	52	46	54	55						
A2	80	100	59	60	48	47	50	48	67	55	59	60	63	64	56	52	52	53	61	61	63	54	54	45	57	58						
B3	63	58	100	97	50	50	49	49	57	52	54	56	52	53	51	50	50	51	56	58	57	57	58	45	53	53						
B4/5	63	58	100	100	49	49	48	48	57	53	54	56	53	54	50	50	50	51	56	57	57	57	58	45	53	53						
C6	55	55	63	63	100	99	82	83	54	49	47	53	54	55	60	66	66	67	47	56	55	48	49	50	41	42						
C7	55	55	63	63	100	100	81	82	54	49	47	53	54	55	60	66	66	67	47	55	54	48	49	51	41	42						
C8	55	55	63	63	85	85	100	94	54	55	55	53	59	60	69	66	66	67	47	57	57	51	51	52	40	41						
C9/10	55	55	63	63	85	85	100	100	55	52	51	52	57	57	65	69	69	70	48	56	56	49	51	49	39	40						
D11/12/13	75	70	63	63	65	65	65	65	100	53	59	59	61	61	53	55	55	56	63	65	65	54	52	52	50	50						
E14	60	45	58	58	45	45	50	50	50	100	73	58	58	57	59	53	53	53	54	54	54	53	52	53	53	53						
E15/16	55	55	47	47	40	40	40	40	65	60	100	53	63	64	54	48	48	48	58	55	56	47	47	57	57	57						
F17	70	65	63	63	60	60	60	60	60	60	45	100	69	69	51	50	50	51	60	63	63	52	52	45	52	51						
F18	70	75	53	53	60	60	60	60	70	45	50	80	100	98	61	61	61	62	63	58	59	48	48	49	54	55						
F19	70	75	53	53	60	60	60	60	70	45	50	80	100	100	62	61	61	62	63	59	60	47	47	48	54	55						
G20	55	55	53	53	55	55	60	60	55	60	40	55	60	60	100	85	85	84	51	47	48	44	45	59	40	41						
G21	55	55	53	53	55	55	60	60	55	60	40	55	60	60	90	100	99	99	53	48	48	46	47	50	46	47						
G22	55	55	53	53	55	55	60	60	55	60	40	55	60	60	90	100	100	98	53	48	48	46	47	50	46	47						
G23	60	60	58	58	60	60	65	65	60	60	40	60	65	65	85	95	95	100	52	49	49	47	48	49	46	47						
Epp24	65	70	58	58	55	55	55	55	80	50	60	55	65	65	65	65	65	60	100	67	68	52	49	49	55	56						
Epp25	63	63	74	74	79	79	79	79	74	53	47	79	68	68	58	58	58	63	63	100	95	56	57	52	53	52						
Epp26	63	63	74	74	79	79	79	79	74	53	47	79	68	68	58	58	58	63	63	100	100	57	56	50	53	52						
H27	63	68	74	74	68	68	68	68	74	53	58	68	58	58	53	53	53	58	63	84	84	100	94	40	46	47						
H28	63	68	74	74	68	68	68	68	68	53	53	68	58	58	53	53	53	58	58	84	84	95	100	43	46	47						
I29	60	50	68	68	60	60	60	60	70	60	55	60	60	60	60	60	60	55	70	63	63	58	58	100	43	44						
J30	56	56	50	50	44	60	39	39	50	50	61	50	56	56	44	44	44	44	50	50	50	56	56	44	100	99						
J31	56	56	50	50	44	44	39	39	50	50	61	50	56	56	44	44	44	44	50	50	50	56	56	44	100	100						

Red color intensity indicates the high similarities. Low similarities are indicated by blue color intensity.

^aValues of similarity to the C-terminal region (above diagonal) to the D-region (below diagonal).

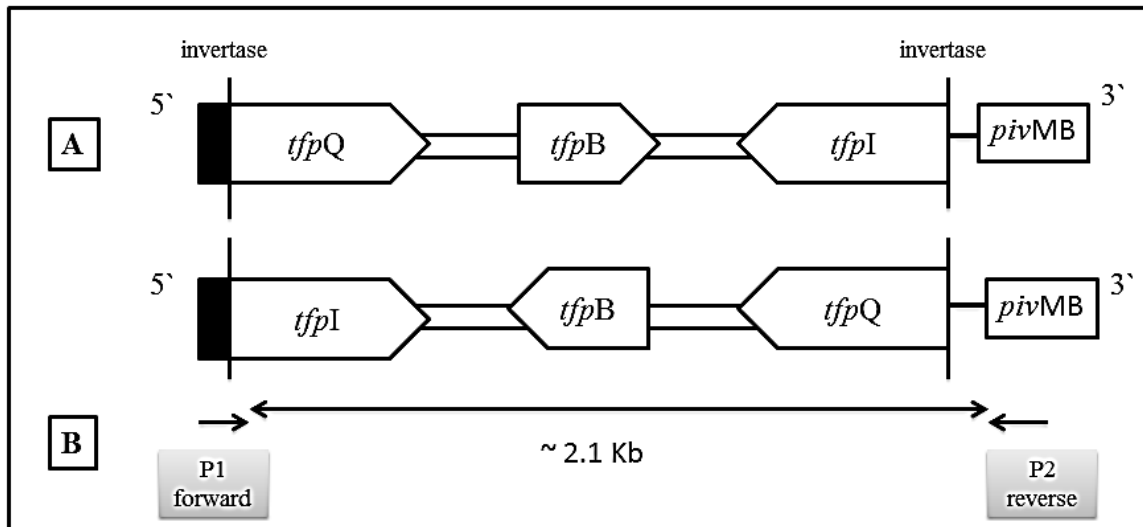


Fig. 1. Schematic representation of type 4 pili of *M. bovis* with the DNA inversion region and location of the primers used for PCR and sequencing. (A) Invertible DNA sequence comprising the two genes *tfpI* and *tfpQ* in opposite orientation. (B) Arrows indicate the site outside the regions of the invertible segment of *M. bovis* Epp63 strain (GenBank ID M32345) used to design the pair of primer (P1 and P2). P1 corresponds to nucleotide 845-866 which comprises part of the leader sequence (black) and N-terminal of mature protein. P2 corresponds to nucleotide 3070-3051 comprising *piv_{mb}* gene that encode Piv-mediated site-specific DNA inversion.

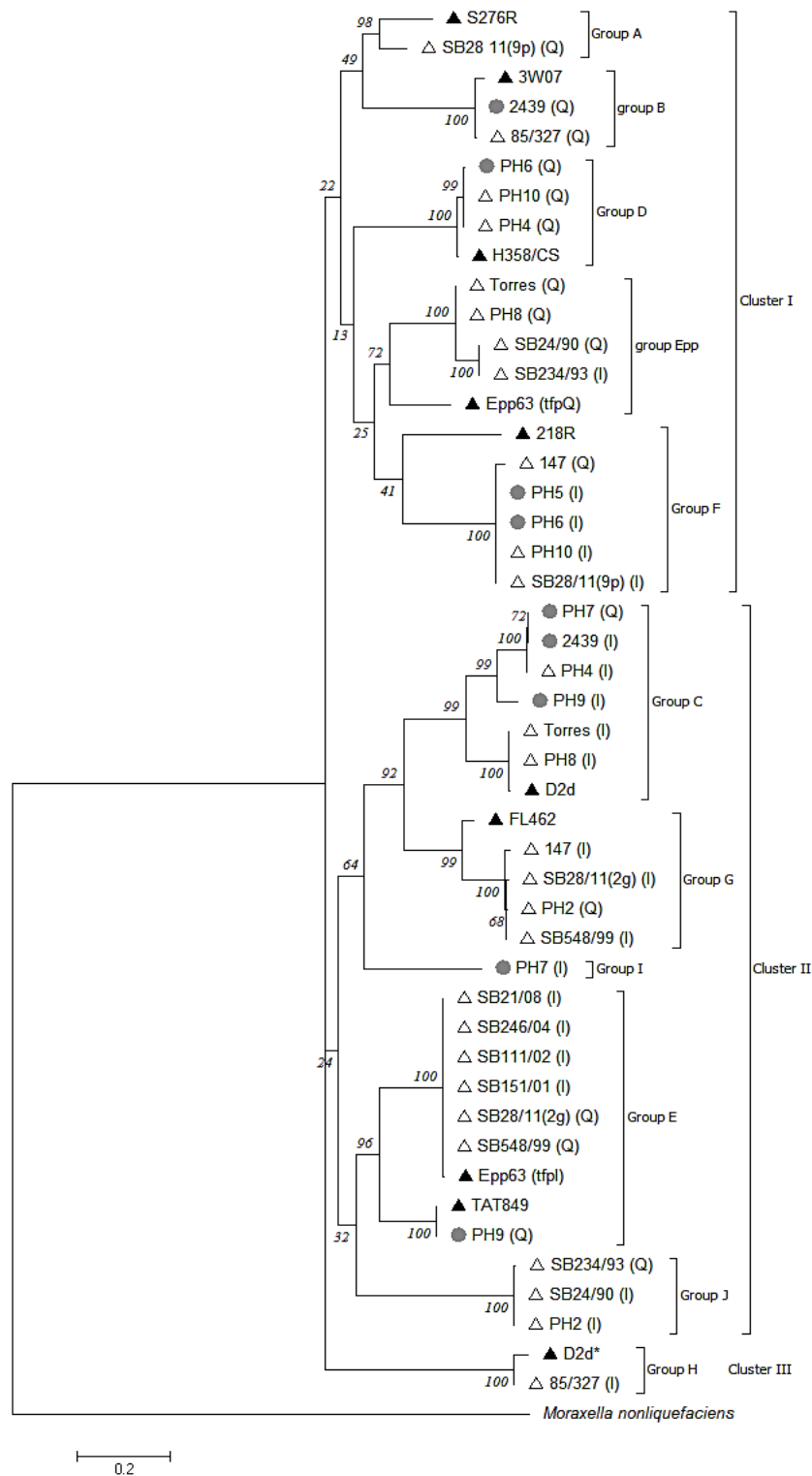


Fig.3. Phylogenetic tree inferred by the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model for the nucleotide sequence of the 3' region of type IV pili (*tfpQ/I*) gene of *Moraxella bovis* strains. Field strains (n = 16) from Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) are indicated by white triangle; vaccine (n = 5) are indicated by grey circle; black triangle indicate reference strains. Only bootstraps value higher than 50% of 1000 replicates are shown. There were a total of 367 positions in the final dataset.

CAPÍTULO 3

Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3` region of *rtxA* gene from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*

Luana D'Avila Farias^a, Agueda Castagna de Vargas^{a*}

(Artigo a ser submetida para publicação – Veterinary Microbiology)

^a Setor de bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 97105-900. *Corresponding author: *Corresponding author: Tel.: +55 55 3220 8107; fone/fax: +55 3220 8257. E-mail address: aguada.vargas@gmail.com.

Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3' region of *rtxA* gene from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*

Abstract

The cytotoxin (MbxA) is one of the main virulence factors of *Moraxella bovis* involved in the pathogenesis of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi*, suspected to be associated with IBK in cattle and sheep, also have the gene encoding the cytotoxin (*movA* and *mbvA*, respectively). The aim of this study was to determine the molecular analysis based on the 3' region of the cytotoxin gene of clinical *Moraxella* spp. isolates. PCR amplification, nucleotide sequencing (nt) and amino acid (aa) sequence prediction were performed, followed by the comparison of sequences, calculation of identity level and analysis of selective pressure. The phylogenetic reconstruction based on nt and aa sequences clearly differentiate *M. bovis* (n = 17), *M. bovoculi* (n = 11) and *M. ovis* (n = 7) and respective reference strains. An alignment of 843 nt revealed high similarity within bacterial species (MbxA = 99.9% nt and aa; MbvA = 99.3% nt and 98.8% aa; MovA = 99.5% nt and 99.3% aa). The similarity of partial sequences (nt 1807-2649) of MbxA in relation to MbvA and MovA ranged from 74.3 to 76.5%; similarity between MbvA and MovA ranged from 95.7% to 97.5%. A negative selection at *mbvA* and *movA* sequences was revealed by the molecular evolution analysis. The phylogenetic and similarity levels allowed to perform a division into sub-groups of sequences of *mbvA* and *movA* according to the period of isolation. Sequence analysis of cytotoxin may provide insights into genetic and evolutionary relationships and into the genetic/molecular basis of *Moraxella* spp.

Keywords: *M. bovis*, *M. bovoculi*, *M. ovis*, RTX operon, hemolysin, cytotoxin, pinkeye.

1. Introduction

MbxA, a cytotoxin and member of RTX (repeats in the structural toxin) family proteins, is thought to be one of major *Moraxella bovis* virulence factor associated with infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) (Angelos et al., 2001). Vaccine trials demonstrated MbxA immunogenic properties, and consequently it has been implied that MbxA may play a regulatory role in the infectious keratoconjunctivitis (IK) development and progression (Angelos et al., 2004; George et al., 2004; Angelos et al, 2007c).

Limited effectiveness of commercially available vaccines containing *M. bovis* and presence of other immunogenic microorganisms in IK lesions imply that other *Moraxella* species may be also involved in the IK pathogenicity (Burns and O'Connor, 2008; Angelos, 2010). Although early investigations proposed *M. ovis*, bacterium involved in sheep eye disease, might be the case (Elad et al., 1988), more recent investigations isolated and identified *M. bovoculi* in cattle lesions (Angelos et al, 2007a; Libardoni et al, 2012; Sosa and Zunino, 2013).

Both *M. ovis* and *M. bovoculi* contain cytotoxin encoding genes called *movA* and *mbvA*, respectively, as well as the entire operon RTX, which was identified in pathogenic strains of *M. bovis* (Angelos et al., 2003; Angelos et al., 2007b). The 3' region of cytotoxin is responsible for the host cell membrane recognition (Frey, 2011).

The present study examined the 3' region of the cytotoxin gene of 35 *Moraxella* spp. strains isolated from cattle and sheep in South America (1983-2013) to provide further insights about similarity levels and phylogenetic relationships inter- and intra-*Moraxella* species of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial characterization

The characterization analysis included 35 bacterial isolates from 32 ocular secretion samples collected from cattle (n=27) and sheep (n=8) displaying clinical signs of IK, sampled between 1983 and 2013. Samples were collected from 32 farms localized in 20 different counties in southern Brazil, 2 counties in Argentina and 1 county in Uruguay (Table 1).

Bacterial isolates were previously identified as *Moraxella* spp. (Angelos and Ball, 2007b; Libardoni et al., 2012; Angelos, 2010). PCR was used to discriminate between *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* as previously reported by Libardoni et al. (2012).

2.2.DNA isolation, PCR amplification and sequencing

Isolates were treated with proteinase K (20mg/ml) for 60 minutes at 37°C and DNA was isolated using CTAB-based (cetyltrimethyl ammonium bromide) method. Subsequently, a second PCR with primers targeting the 3' region of the cytotoxin gene was performed. This step strengthened the previous molecular identification of *Moraxella* species. For the second PCR, primers were designed targeting the *mbxA* gene of *M. bovis*, *mbvA* gene of *M. bovoculi* and *movA* gene of *M. ovis* (Table 2). Approximately 50 ng of extracted DNA was used as template in a final volume of 25µL, containing 5µL of GoTaq® buffer (Promega), 0,4mM of each primer, 200µM of deoxynucleotideo triphosphate (dNTP), 1 U GoTaq DNA polymerase and ultrapure water. Both amplifications were performed using an initial denaturing step at 95°C for 5 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 50 seconds, 65°C for 50 seconds, 72°C for 10 seconds, and a final extension step of 72°C for 4 minutes. The amplification products were verified in 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5mg mL⁻¹).

The PCR products were sequenced by ACTGene Molecular Analysis LTDA (Biotechnology Center, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automated sequencer

ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer armed with capillary 50cm and POP6 polymer (Applied Biosystems).

2.3. Nucleotide sequencing and analysis

The quality of the DNA sequences were analyzed by GAP software implemented in Staden Package (Staden, 1996) and the overlap of the fragments of each sequence was used to perform a consensus sequence.

The consensus sequences from fragments of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* were respectively compared with the *mbxA* gene of *M. bovis* (strain Epp63; GenBank ID EF436235), *mbvA* gene of *M. bovoculi* (strain 237T; GenBank ID AOMT00000000) and *movA* gene of *M. ovis* (strain ATCC 33078; GenBank DQ155443 ID), using the database and the NCBI BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Based on the nt sequence, the aminoacid (aa) sequences corresponding to 3' region of the cytotoxin were translated in reading frame 1 on the direct strand by The Sequence Manipulation Suite software version 2 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>).

The sequences of translated aa were submitted to comparison using protein homology/analogy recognition engine (Phyre 2) server (Kelley and Sternberg, 2009). The alignment of the sequences (nt and deduced aa) were made using Clustal W software implemented in MEGA 6. The identity matrix was obtained by the BioEdit software and SWAAP 1.0.3 software (<http://www.bacteriamuseum.org/SWAAP/SwaapPage.htm>). The MODELTEST software was used to determine the best evolutionary model for substitution of nucleotides (<http://www.hiv.lanl.gov>) and MEGA 6 was used to determine the best evolutionary model for aa replacement in the analyzed group of sequences.

2.4. Phylogenetic analysis

The phylogenetic reconstruction was performed using MEGA 6 (Tamura et al., 2013) based on the Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-joining (NJ) methods. The most appropriate method for nt and aa substitution was selected using Akaike Information Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC). In order to verify the topology branches, the values of bootstrap were calculated using 1000 replicates.

The nt sequences of cytotoxin of *M. bovis* (GenBank ID EF436235), *M. bovoculi* (GenBank ID AOMT00000000), *M. ovis* (GenBank ID DQ155443), as well as the translations used as reference sequences were obtained from GenBank. Additionally, it was used sequences of *mbxA* gene from *M. bovis* SFS9a strain (GenBank ID EF436243) and *mbvA* gene from *M. bovoculi* 371 strain (GenBank ID DQ155439), as well as the 3' region of *LktA* gene from *Mannheimia haemolytica* (GenBank ID P0C085), which was applied as an outgroup.

2.5. Selective pressure analysis

The selective pressure analysis on cytotoxin genes was determined using synonymous and nonsynonymous substitutions, and the distance between them was calculated based on the Nei–Gojobori method (Nei and Gojobori, 1986). The rates of dN/dS and the rates of transition and transversion were calculated based on Kimura 2-Parameter, via SWAAP 1.0.3, Mega 6, from SNAP software (*synonymous and nonsynonymous analysis program*) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/SNAP/SNAP.html>) and the DnaSP 5.10 software (*sequence polymorphism*) (Librado and Rozas, 2009). The DnaSP 5.10 software was also used to divide the studied sequences in alleles.

3. Results

The 35 bacterial isolates were classified as: 17 *Moraxella bovis*, 11 *Moraxella bovoculi* and seven *Moraxella ovis*. The *M. bovis* strains were collected from 1983 to 2012, *M. bovoculi* 1986 to 2010, and *M. ovis* 1998 to 2013 (Table 1).

The PCR assay that was performed to discriminate *Moraxella* species can be considered specific, since the primers pair targeting *mbxA* gene was unable to amplify the *mbvA* and *movA* genes. Similarly, the primers pair for *mbvA* and *movA* genes was unable to amplify the *mbxA* gene (data not shown).

Two isolates obtained from the same IK outbreak in sheep were identified as *M. bovoculi* (SB296a) and *M. ovis* (SB296b). Our cytotoxin gene analysis identified one bovine isolate, previously suggested to be *M. ovis* (Libardoni et al., 2012), as *M. bovoculi* (SB150b).

3.1. Nucleotide sequencing and amino acid deduced analysis

The genes of cytotoxin from *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* strains were partially sequenced. The sequenced fragment covered the coding region of the COOH-terminus of the RTX cytotoxin family. The length of the edited sequences varied from 850 to 940 nt. A consistent alignment provided by 843 nt (genome position of *mbxA* gene of *M. bovis* Epp63; *mbvA* gene of *M. bovoculi* 237T; *movA* gene of *M. ovis* ATCC 33078: nt 1807-2649, residues aa 603-883) revealed a high degree of similarity between sequences of the same species and also between *M. bovoculi* and *M. ovis*, indicating a high conserved region. The degree of similarity between the sequences of *M. bovis* strains was 99.9% (100% similarity between all field isolates and *M. bovis* EPP63 reference strain), while among MbvA sequences and among MovA sequences an average of 98.8% (values ranged from 97.5 to 100%) and 99.3% (98.5-100%) of similarity was reported, respectively.

The similarity degree of MbxA sequences relative to MbvA and MovA was 77.6% (values ranged from 77.1 to 78.1%). On the other hand, the similarity among MbvA and MovA sequences ranged from 95.7% to 97.5%.

Nucleotide substitutions investigated in the present study are shown in Table 3. All 17 *M. bovis* strains, including *M. bovis* Epp63, shared the same allele, named 1bx, while SFS9a strain resulted in other allele designed 2bx. Eleven *M. bovoculi* strains were divided into seven alleles concentrated along the 1bv and 7bv, while the seven strains of *M. ovis* resulted in five different alleles, which were clustered in 2ov to 6ov allele.

The sequences of the *mbvA* gene strains of *M. bovoculi* recovered from the database, showed 100% of similarity with some field strains [strain 237^T = 1bv allele (n = 3) and strain 371 = 2bv allele (n = 3)]. The sequence of the *movA* gene of *M. ovis* reference strain did not share the allele (1ov allele) with another field strain, but showed greater similarity with the sequences of the oldest strains (2ov allele = 99.5% and 3ov allele = 99.6%) compared to the most recent strains (4ov allele = 99.2% and 5ov and 6ov allele = 99.4%).

Fifteen alleles observed between the three species of *Moraxella* were established based on the 201 nt positions of the 3' region of the cytotoxin gene, in which there was a nt substitution in at least two strains. Most of the differences in nucleotides were observed between *M. bovis* strains and *M. bovoculi*/*M. ovis* strains, or vice versa. Even though no insertions or deletions were found, nucleotide substitution was encountered (Tab 3). No nucleotide substitutions among partial sequences of *mbxA* gene of *M. bovis* strains were found. The nt substitutions observed in this species occurred only in relation to *M. bovis* SFS9a strain. Thus, most of the nt substitutions were seen among the three species of *Moraxella*, and within *M. bovoculi* and *M. ovis*.

Five residues helped to distinguish *M. bovoculi* from *M. ovis*. Moreover, two of these residues (657 and 854) were also effective in distinguishing the three species of *Moraxella*

analyzed in this study. All nt substitutions that were effective in separating *M. bovoculi* and *M. ovis* were nonsynonymous, therefore originating five different residues between these species (Table 3). In four of these positions the substitutions were transitions among purines and one transversion.

Regarding the four transition substitutions, two substitutions resulted in residues (657 and 854) with different characteristics in the three species of *Moraxella*. The other three residues (717, 735 and 815) could only differ *M. bovoculi* from *M. ovis*, since *M. bovis* and *M. bovoculi* strains showed the same residues 717 and 735, and *M. bovis* and *M. ovis* strains showed the same residue 815. Even though *M. bovis* and *M. bovoculi* strains presented the same aa at residue 717, they did not have the same encoding codon.

3.1.1. *M. bovoculi*

Thirteen nt substitutions were found among *M. bovoculi* strains. Five of these substitutions were synonymous and eight nonsynonymous. The nonsynonymous substitutions were observed mainly at position 2246-2276, which is the only one that showed both transitions ($T_i = 0.116$) and transversions ($T_v = 0.059$). Moreover, at position 2246 a triple nt substitution (guanine-adenine-thymine) was observed. This codon corresponds to residue 749, in which the triple shift of nt resulted in three amino acids (Thr-Ala-Ser) (Table 3). Most of nt substitutions identified in this study were found to be transitions. Transversion substitution was only observed at position 2103 ($T_v = 0,059$), which constitute the codon corresponding to residue 701 (Table 3).

Six positions, three synonymous and three nonsynonymous, were found effective in discriminating the strains that constitute the 3bv allele (prior to 1990) from other alleles (nt positions: 1857, 2103, 2246, 2250, 2268, 2410). In these six positions, strains isolated prior to 1990 (3bv allele), showed identity with *M. bovis* strains at five positions, while other *M.*

bovoculi alleles had higher identity with isolates of *M. ovis*, also presenting five identity positions. The nonsynonymous substitutions resulted in residues 701, 749 and 804 (allele 3bv: Lys-Ser-Val, respectively) in which presented greater identity with *M. bovis* strains (Lys-Ser_Val) and identity just at residue 701 with *M. ovis* strains (Lys-Ala-Ile), while the remaining *M. bovoculi* alleles (Asn-Ala/Thr-Ile) presented identity with *M. ovis* strains at residue 749 and 804 (Table 3). In addition, the *M. bovoculi* allele 1bv, which comprises 237^T strain, unlike all the other alleles showed a threonine.

For nonsynonymous substitutions, 4bv, 5bv and 7bv alleles showed the greatest amount of different residues in apparently conserved positions between the three species of *Moraxella*. Almost all of these alleles of *M. bovoculi* showed disparity at positions 606, 638 and 673 (Table 3). Alleles 4bv and 5bv presented a valine at residue 606, while the others *M. bovoculi* and *M. ovis* alleles presented a alanine and *M. bovis* an aspartic acid. At residues 638 and 673, the alleles 4bv, 5bv and 7 bv showed a serine and lysine, respectively, while the all others alleles showed an asparagine and an arginine. The 6bv allele presented a single nonsynonymous substitution at position 2224, which resulted in aspartic acid at residue 742, similarly to the results found for *M. bovis* strains (Table 3). Among the other *M. bovoculi* alleles, similar to what occurred in *M. ovis* strains, asparagine was found at residue 742.

3.1.2. *M. ovis*

Among the *M. ovis* strains there were nine nt substitutions in the partial *movA* gene sequences, five synonymous and four nosynonymous. Among them, two nonsynonymous and two synonymous substitutions differentiated older and more recent strains [2ov, 3ov alleles (≤ 2005) X 4ov, 5ov, 6ov alleles (≥ 2007)]. The nonsynonymous substitutions are equivalent to residues 773, 829 and 875 and respectively resulted in a lysine, glycine and aspartic acid in the older *M. ovis* strains; and a treonine, serine and asparagine among the recent strains (Table

3). The *M. ovis* reference strain and the older *M. ovis* strains presented the same aa at residues 773 and 829, while the reference strain and the more recent strains presented the same aa at residue 875. Only one field strain showed a nonsynonymous substitution at position 2621. This substitution resulted in a valine at residue 874, while the other *M. bovis* and *M. bovoculi* strains, presented an alanine (Table 3).

Differently from *M. bovoculi*, *M. ovis* strains presented substitutions from guanine/cytosine to adenine/thymine more often among the recent isolates. Most of the nt substitutions among the *movA* gene sequences are transitions, mainly involving pyrimidines. Among nine nt substitutions, eight were found to be transitions and one was transversion. A Tv was observed at position 2319 ($Tv = 0.43$), one of the nonsynonymous substitutions separate the strains according to the year that they were isolated, as described previously.

3.1.3. *M. bovis*

All field isolates identified as *M. bovis* showed 100% of identity with the partial sequence of *mbxA* gene from *M. bovis* Epp63 and 99.9% with *M. bovis* SFS9a strain. Differences occurred in residues 666 and 823 (not shown in Table 3). The residue 666 from *M. bovis* SFS9a strain showed the same aa (glutamic acid) found in *M. bovoculi* and *M. ovis*. On the other hand, residue 823 of the *M. bovis* SFS9a strain showed an aspartic acid, and the remaining *M. bovis* strains showed an asparagine, while *M. ovis* and *M. bovoculi* strains presented a lysine.

3.2. Selective pressure analysis

The calculation of dN/dS ratio based on the number of synonymous and non-synonymous amino acid substitutions in the 3' region of the cytotoxin genes was performed. The calculation result of dN/dS for *mbxA* gene of *M. bovis* strains was incalculable.

For *M. ovis* strains, the average of dN/dS ratio, based on the number of synonymous substitutions dS (dS = 0.0114) and nonsynonymous dN (dN = 0.0026) in the sequences of the cytotoxin gene resulted in a dN/dS ratio <1 (dN/dS = 0.236). The calculation of the average of synonymous substitutions dS (dS = 0.0159) and nonsynonymous dN (dN = 0.0048) ratio in the cytotoxin gene of *M. bovoculi* strains resulted in an average of dN/dS ratio <1 (dN/dS = 0.301). Thus, the evolutionary test of the 3' region of the *mbvA* and *movA* genes showed that the hypothesis of purifying or negative selection was accepted for both species. Nevertheless, comparisons within each gene produced dN/dS rate > 0.8. This comparison involved 3ov and 6ov alleles of *M. ovis* and 4bv and 6bv alleles of *M. bovoculi*.

When the ratio dN/dS rates was carried out for the three *Moraxella* species (average rate of dN/dS = 0.14 ± 0.32), purifying selection was observed among most of the alleles. The highest rates were observed between 4bv, 5bv and 6bv alleles of *M. bovoculi* and all *M. ovis* alleles. In these alleles, dN/dS ratio was between 0.7 and 2.6. The lowest dN/dS rates occurred in relation to the oldest *M. ovis* strains. The highest dN/dS rate was observed between the 5bv allele of *M. bovoculi* and 5ov allele of *M. ovis*, which are both alleles present in strains isolated in 2007.

3.3. Phylogenetic analysis

Phylogenetic reconstruction of nt and aa sequences of the 3' region of cytotoxin based on Maximum Likelihood (ML) e Neighbor-Joining (NJ) methods, did not result in a complete similar distribution between the methods. Phylogenetic trees containing two main branches were originated by both methods. *M. bovis* strains were grouped in cluster I, and *M. bovoculi* and *M. ovis* in cluster II. Thus, the field and reference strains of *M. bovoculi* and *M. ovis* were close to each other, while *M. bovis* strains were distant from *M. bovoculi* and *M. ovis* strains (Figs. 1A and 1B).

Regarding cluster II, reconstructions obtained from NJ method displayed two major subgroups, thus separating *M. bovoculi* and *M. ovis* strains. In contrast, an extra branch was originated by ML method, from which the subgroups in cluster II were originated and hence retained the species separated. Importantly, 3bv allele of *M. bovoculi* strains was presented in this extra branch. Therefore, the strains with 3bv allele (n = 3), isolated before 1990, were not grouped with other *M. bovoculi* strains, remaining closer to *M. bovis* strains.

The phylogenetic analysis was consistent with results from the PCR assay applied to classify the *Moraxella* species. Reservations occurred with older *M. bovoculi* strains (3bv allele) and with SB150b strain (7bv allele), which was classified as *M. ovis* in a previous study of this group.

M. bovoculi strains were further divided into two branches within its subgroup (except the 3bv allele), however; in these branches it was not possible to differentiate the strain according to the year of isolation. Interestingly, *M. ovis* strains, which were also divided into two branches, could be differentiated according to the year of isolation.

4. Discussion

The present study analysed the 3' region of cytotoxin gene of 35 *Moraxella* spp. strains isolated from bovine and ovine in South America (in addition to reference strains of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*), in order to provide insights into the genetic composition/diversity of *Moraxella* spp. cytotoxin. Previous studies on cytotoxin gene of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* are available in the literature (Angelos et al., 2003; Angelos et al., 2007c). Among them, only one study has investigated the relationship of cytotoxins of *M. bovis* in the United States showing few differences among *M. bovis* strains, which were not sufficient to result in antigenic diversity (Angelos and Ball, 2007a). Thus, this is the first analysis of cytotoxin covering specifically the 3' region, in addition to MbxA protein of *M. bovis*, the MbvA of *M. bovoculi* and MovA of *M. ovis*.

All *M. ovis* strains investigated in the present study were derived from lesions of contagious ophthalmia in sheep, while *M. bovoculi* and *M. bovis* strains were isolated from IK lesions in cattle. Both *M. bovoculi* and *M. ovis* strains were isolated from the same eye lesion in sheep. Since the first description of *M. bovoculi*, studies from different parts of the world reported its isolation from eye lesions in cattle (Angelos et al, 2007a; Libardoni et al, 2012; Sosa and Zunino, 2013); however, the exact role played by this species in the pathogenesis of IK is still not fully understood. Some of the isolates used in this study were previously identified by Libardoni et al. (2012), and others were classified as *M. bovis* by Conceição et al. (2004) (Table 1). An inconsistency was found for one isolate (SB150B), which was earlier identified as *M. ovis* by Libardoni et al. (2012) and in the present study it was classified as *M. bovoculi* (7bv allele).

Similarly to a previous study that compared the aa sequences of the *M. bovis* cytotoxin in different strains (Angelos and Ball, 2007a), the results found for South American strains showed a hyper conservation of the 3' region of MbxA. Furthermore, the 17 isolates identified as *M. bovis* showed 100% identity with the partial sequence of the *mbxA* gene from the reference strain *M. bovis* Epp63 and 99.2% with *M. bovis* SFS9a strain. Our results imply that cytotoxin sequence is highly conserved among species and it is suggested that MbxA-based vaccines may be considered protective.

According to the results of this study, the cytotoxin genes of *M. bovis* strains appeared to be under weak purifying selection. Therefore, different to what was reported for type IV pili (Conceição et al., 2004; McConnell et al., 2008); apparently the cytotoxin of *M. bovis* does not require continuous surveillance of isolates from IK outbreaks (Conceição et al., 2004; McConnell et al., 2008). In contrast, *M. bovoculi* and *M. ovis* did not display conserved sequences such as cytotoxin of *M. bovis*.

Similar to the results reported by Angelos et al. (2007b), the *mbvA* and *movA* genes showed a high degree of similarity between species. In this study it was observed that there is a high similarity within species, even though the intra-species similarity was lower than that observed for *M. bovis* isolates. Interestingly, the *mbvA* and *movA* genes presented high similarity for both South America strains and reference strains from different geographical areas. Moreover, some South American and North American strains shared the same allele, but displayed less similarity with other strains from their geographical areas (Table 1).

Regarding the structure of the RTX toxin family, both *mbvA* and *movA* genes from all isolates showed the seven rich repeat glycine and the preservation of the lysine acetylation site at residue 660. Similar results were also described for the reference strains (Angelos et al., 2007b). Comparison between the 3' region of *mbvA* and *movA* genes of *M. bovoculi* and *M. ovis*, respectively, displayed the same degree of similarity than the whole sequence of *mbvA* and *movA* genes (Angelos et al., 2007b). The same was not verified when comparing the 3' region of *mbvA* and *movA* genes in relation to *mbxA*. The similarity between *mbvA* and *movA* genes in relation to *mbxA* was 82% (Angelos et al., 2007c), when the calculation of similarity included only the C-terminal region, it decreased to 77%. Thus, the C-terminal fragment of the cytotoxin used to recognize the host cell receptor and researches on recombinant vaccines for IBK share a moderate similarity between *M. bovis* and *M. bovoculi* and *M. ovis* (Angelos et al., 2007b; Angelos et al., 2010; Angelos et al., 2012). In fact, antiserum against the carboxy terminus of *M. bovoculi* MbvA neutralized hemolytic activity of both *M. bovoculi* and *M. ovis*, but did not neutralize the hemolytic activity of *M. bovis* (Angelos et al., 2007b).

Even though the similarity of the C-terminal region of the *mbvA* and *movA* gene sequences is significantly high, it is suggested that distinction between *M. bovoculi* and *M. ovis* might be performed based on five nt positions. Surprisingly, all nt substitutions that were effective in separating *M. bovoculi* and *M. ovis* were nonsynonymous, therefore originating

five different residues between these species (Table 3). In four of these positions, the substitutions were transitions between purines; the only transversion resulted in an exchange of leucine in *M. bovoculi* strains to isoleucine in *M. ovis* strains, while *M. bovis* strains also displayed a leucine. A transversion resulted in an aa exchange containing similar characteristics, while transition substitutions resulted in exchange of aa with different properties (e.g. charge, hydrophobicity, etc.).

Phylogenetic reconstructions based on the maximum likelihood and neighbour joining methods were performed for nt and aa sequences, intending to investigate both evolutionary events and genetic distance (Nei and Kumar, 2000). As the results obtained in each analysis by different methods showed some discrepancies (Figs. 1A and 1B). Apparently, no association was found between phylogenetic distance and geographical distribution, however some associations between phylogenetic distance and temporal distribution were found. Despite the three species of *Moraxella* evaluated in this study could be distinguished by molecular phylogeny, when the phylogeny was based on evolutionary events, the oldest *M. bovoculi* strains (allele 3bv) originated a more basal branch to the branch that divided the remaining *M. bovoculi* strains and *M. ovis* strains (Fig. 1B). The similarity between the partial sequence of the cytotoxin of *M. bovoculi* allele 3bv (isolated prior to 1990) and the *M. bovis* strains was slightly higher when compared to the other *M. bovoculi* and/or *M. ovis* alleles and *M. bovis* alleles. In addition, there are three positions in the 3bv allele, in which the nt and the respective residues differ from other *M. bovoculi* strains, but are similar to *M. bovis* strains (Table 3). Even though the number of *M. ovis* strains investigated is small, it is possible to observe separation of the strains into two subgroups: (a) the oldest isolates (<2005), (b) and more recent ones (> 2007). The nonsynonymous substitutions that differentiate *M. ovis* resulted in residues 773, 829 and 875. At these positions the most recent strains showed

greater similarity with isolates of *M. bovis* and *M. bovoculi*. Except for the allele 3bv, other strains of *M. bovoculi* were not being separated according to the year of isolation.

In relation to the evolution of the three species, the *mbxA* gene appeared to be hyper-conserved among *M. bovis* strains, supporting the notion of the importance of the toxin in this species. On the other hand, the cytotoxin gene of *M. bovoculi* and *M. ovis* were likely to be under purifying selection. Furthermore, when the 3' regions of *mbvA* and *movA* genes were compared, apparently the most recent isolates of *M. bovoculi* tended to be more similar to isolates of *M. ovis* strains.

5. Conclusion

In summary, cytotoxin-based phylogenetic analysis of *Moraxella* spp strains provided a clear differentiation between species of veterinary interest. Sequence analysis revealed a high conserved region within bacterial species, which is still considered a less conserved region between *M. bovis* in relation to *M. bovoculi* and *M. ovis*. In fact, *M. bovis* strains from South America displayed a hyper conservation of the 3' region of *MbxA*. Sequence analysis of cytotoxin may provide insights into genetic and evolutionary relationships and into the genetic/molecular basis of *Moraxella* spp.

References

- Angelos, J.A., 2010. *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis: Cause or coincidence? *Vet. Clin. North. Am. Food.: Anim. Pract.* 26, 73-78.
- Angelos, J.A., Ball, L.M., 2007a. Relatedness of cytotoxins from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*. *Vet. Microbiol.* 124, 382-386.
- Angelos, J.A.; Ball, L.M., 2007b. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid *Moraxellae* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 532-534.

- Angelos, J.A., Hess, J.F., George, L.W., 2001. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1222-1228.
- Angelos, J.A., Hess, J.F., George, L.W., 2003. An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Vet. Microbiol.* 92, 363-377.
- Angelos, J.A., Hess, J.F., George, L.W., 2004. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with are recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vaccine.* 23, 537-545.
- Angelos J.A., Spinks, P.Q., Ball, L.M., George, L.W., 2007a. *Moraxella bovoculi* sp. nov. isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 7:789-795.
- Angelos, J.A., Ball, L.M., HESS, J.F., 2007b. Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet. Microbiol.* 125, 73-79.
- Angelos, J.A., Bonifacio, R.G., Ball, L.M., Hess, J.F., 2007c. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin-*Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vet. Microbiol.* 125, 274-283.
- Angelos, J.A., Lane, V.M., Ball, L.M., Hess, J.F., 2010. Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. Res. Commun.* 34, 229-239.
- Angelos, J.A., Gohary, K.G., Ball, L.M., Hess, J.F., 2012. Randomized controlled field trial to assess efficacy of a *Moraxella bovis* pilin-cytotoxin-*Moraxella bovoculi* cytotoxin subunit vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am. J. Vet. Res.* 73, 1670-1675.
- Burns, M.J., O'Connor, A.M. 2008. 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*. 26, 144-152.
- Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., Paolichi, F., Leturia, A.C., Gil-Turnes, C., 2004. Molecular diversity of *Moraxella bovis* isolated from Brazil, Argentina and Uruguay over a period of three decades. *Vet. J.* 167, 53-58.
- Elad, D., Yeruham, I., Bernstein, M., 1988. *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). *J. Vet. Med. B.* 35, 431-434.
- Frey, J., 2011. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. *Vet. Microbiol.* 153, 51-58.
- George, L.W., Angelos, J.A., Ruehl, W.W., 2004. Stability, antigenicity, and aggregation of *Moraxella bovis* cytolysin after purification and storage. *Am. J. Vet. Res.* 65, 977-983.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E., 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4, 363-371.
- Libardoni, F., Scherer, C.F.C., Farias, L., Vielmo, A., Balzan, C., Vargas A.C., 2012. *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 743-746. (in Portuguese, with English abstract)
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451-1452.
- McConnel, C.S., Shum, L., Gleeson, B.L., House, J.K., 2008. Serologic cross-reactivity of Australian *Moraxella bovis* to vaccinal bacterin strains as determined by competitive ELISA. *Aust Vet J.* 86, 124-129.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418-426.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333p.

- Sosa, V., Zunino, P., 2013. Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. *J Infect Dev Ctries.* 7, 819-824.
- Staden, R., 1996. The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 1596-1599.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.

Table 1. *Moraxella bovoculi*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovis* strains from IK outbreaks and the reference strains.

Strain	Classification	Origin	Year	Host	Alleles	GenBank ID
237 ^T	<i>M. bovoculi</i>	(-)	(-)	(-)	1bv	AOMT00000000
371	<i>M. bovoculi</i>	US	2002	Bovine	2bv	DQ155439
GR9	<i>M. bovoculi</i>	Br	1986	Bovine	3bv	KP410763
R2	<i>M. bovoculi</i>	Br	1989	Bovine	3bv	KP410764
R7	<i>M. bovoculi</i>	Br	1989	Bovine	3bv	KP410765
SB273	<i>M. bovoculi</i>	Br	1996	Bovine	4bv	KP410767
186V	<i>M. bovoculi</i>	Ar	1999	Bovine	1bv	KP410766
SB150a	<i>M. bovoculi</i>	Br	2002	Bovine	2bv	KP410768
SB163 N2	<i>M. bovoculi</i>	Br	2003	Bovine	2bv	KP410769
SB163 N5	<i>M. bovoculi</i>	Br	2003	Bovine	1bv	KP410770
SB296a	<i>M. bovoculi</i>	Br	2007	Ovine	5bv	KP410771
SB139	<i>M. bovoculi</i>	Br	2010	Bovine	6bv	KP410772
SB150b	<i>M. bovoculi</i>	Br	2010	Bovine	7bv	KP410773
ATCC33078	<i>M. ovis</i>	(-)	(-)	(-)	1ov	DQ155443
Nunes	<i>M. ovis</i>	Br	1998	Ovine	2ov	KP410774
SB567	<i>M. ovis</i>	Br	2005	Ovine	3ov	KP410775
SB296b	<i>M. ovis</i>	Br	2007	Ovine	4ov	KP410776
SB326	<i>M. ovis</i>	Br	2007	Ovine	5ov	KP410777
SB06	<i>M. ovis</i>	Br	2008	Ovine	6ov	KP410778
SB07a	<i>M. ovis</i>	Br	2008	Ovine	5ov	KP410779
SBP07b	<i>M. ovis</i>	Br	2013	Ovine	5ov	KP410780
ATCC Epp63	<i>M. bovis</i>	(-)	(-)	(-)	1bx	EF436235
SFS9a	<i>M. bovis</i>	US	(-)	Bovine	2bx	EF436243
2439	<i>M. bovis</i>	Uy	1983	Bovine	1bx	Conceição et al., 2004
85/327	<i>M. bovis</i>	Ar	1985	Bovine	1bx	Conceição et al., 2004
SB24	<i>M. bovis</i>	Br	1990	Bovine	1bx	KP402166
SB234	<i>M. bovis</i>	Br	1993	Bovine	1bx	KP402167
PH02	<i>M. bovis</i>	Br	1995	Bovine	1bx	KP402168
PH05	<i>M. bovis</i>	Br	1996	Bovine	1bx	KP402169
PH06	<i>M. bovis</i>	Br	1997	Bovine	1bx	KP402170
PH07	<i>M. bovis</i>	Br	1998	Bovine	1bx	KP402171
PH08	<i>M. bovis</i>	Br	1998	Bovine	1bx	KP402172
PH09	<i>M. bovis</i>	Br	1999	Bovine	1bx	KP402174
SB548	<i>M. bovis</i>	Br	1999	Bovine	1bx	KP402173
PH10	<i>M. bovis</i>	Br	2000	Bovine	1bx	KP402175
Torres	<i>M. bovis</i>	Br	2000	Bovine	1bx	KP402176
SB246	<i>M. bovis</i>	Br	2004	Bovine	1bx	KP402177
SB21	<i>M. bovis</i>	Br	2008	Bovine	1bx	KP402178
SB207 C21	<i>M. bovis</i>	Br	2009	Bovine	1bx	KP402179
SB111	<i>M. bovis</i>	Br	2012	Bovine	1bx	KP402180

US, United States of America; Br, Brazil; Ar Argentina; Uy, Uruguai; (-), Not informed.

Table 2. Primers used in the PCR assays.

Specificity	Sense	Sequence 5`-3`	Lenght of amplicon (base pairs)
<i>mbxA</i> (<i>M. bovis</i>)	Forward	GCAAAAGCTGGCAATGACGA	943
	Reverse	GTGCCATTGACCCAAGTAGC	
<i>mbvA</i> (<i>M. bovoculi</i>) and <i>movA</i> (<i>M. ovis</i>)	Forward	AATGCTGGTGCTGGTAACGA	990
	Reverse	TGGTTGCAGGGTATTGGAGC	

Table 3. Differences found in comparison to the amino acid sequences of 3` region of cytotoxin genes (*mbvA* and *movA*) between 11 *Moraxella bovoculi* strains and eight *Moraxella ovis* strains, and *mbxA* gene of 17 *Moraxella bovis* strains at the same positions.

Allele ^a (n ^b)	Amino acid ^c																
	606	638	657	673	701	717	735	742	749	758	773	804	815	829	854	874	875
237^{Td}	Ala	Asn	Ala	Arg	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Thr	Thr	Ile	Val	Gly	Ser	Ala	Asn
371^e	*	*	*	*	*	*	*	*	Ala	Ala	*	*	*	*	*	*	*
1bv (2)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2bv (2)	*	*	*	*	*	*	*	*	Ala	Ala	*	*	*	*	*	*	*
3bv (3)	*	*	*	*	Lys	*	*	*	Ser	Ala	*	Val	*	*	*	*	*
4bv (1)	Val	Ser	*	Lys	*	*	*	*	Ala	*	*	*	*	*	*	*	*
5bv (1)	Val	Ser	*	Lys	*	*	*	*	Ala	Ala	*	*	*	*	*	*	*
6bv (1)	*	*	*	*	*	*	*	Asp	Ala	Ala	*	*	*	*	*	*	*
7bv (1)	*	Ser	*	Lys	*	*	*	*	Ala	*	*	*	*	*	*	*	*
33078^d	*	*	Thr	*	Lys	Ile	Gln	*	Ala	Ala	Lys	*	Ile	*	Gly	*	*
2ov (1)	*	*	Thr	*	Lys	Ile	Gln	*	Ala	Ala	Lys	*	Ile	*	Gly	*	Asp
3ov (1)	*	*	Thr	*	Lys	Ile	Gln	*	Ala	Ala	Lys	*	Ile	*	Gly	*	Asp
4ov (1)	*	*	Thr	*	Lys	Ile	Gln	*	Ala	Ala	*	*	Ile	Ser	Gly	Val	*
5ov (3)	*	*	Thr	*	Lys	Ile	Gln	*	Ala	Ala	*	*	Ile	Ser	Gly	*	*
6ov (1)	*	*	Thr	*	Lys	Ile	Gln	*	Ala	Ala	*	*	Ile	Ser	Gly	*	*
Epp63^d	Asp	*	Lys	*	Lys	*	*	Asp	Ser	Ala	*	Val	Ile	Ser	Lys	*	Asp
1bx (17)	Asp	*	Lys	*	Lys	*	*	Asp	Ser	Ala	*	Val	Ile	Ser	Lys	*	Asp
SFS9a^e	Asp	*	Lys	*	Lys	*	*	Asp	Ser	Ala	*	Val	Ile	Ser	Lys	*	Asp

^aNumber denoted to the alleles found in this study.

^bTotal number of strains in each allele.

^cDifferent amino acids in relation to the *Moraxella bovoculi* 237^T strain are displayed in the table, whereas the asterisks indicate the same amino acid.

^dReference strain is highlighted in bold (237^T = *M. bovoculi*, 33078 = *M. ovis*, Epp63 = *M. bovis*).

^eStrains information obtained from GenBank[®].

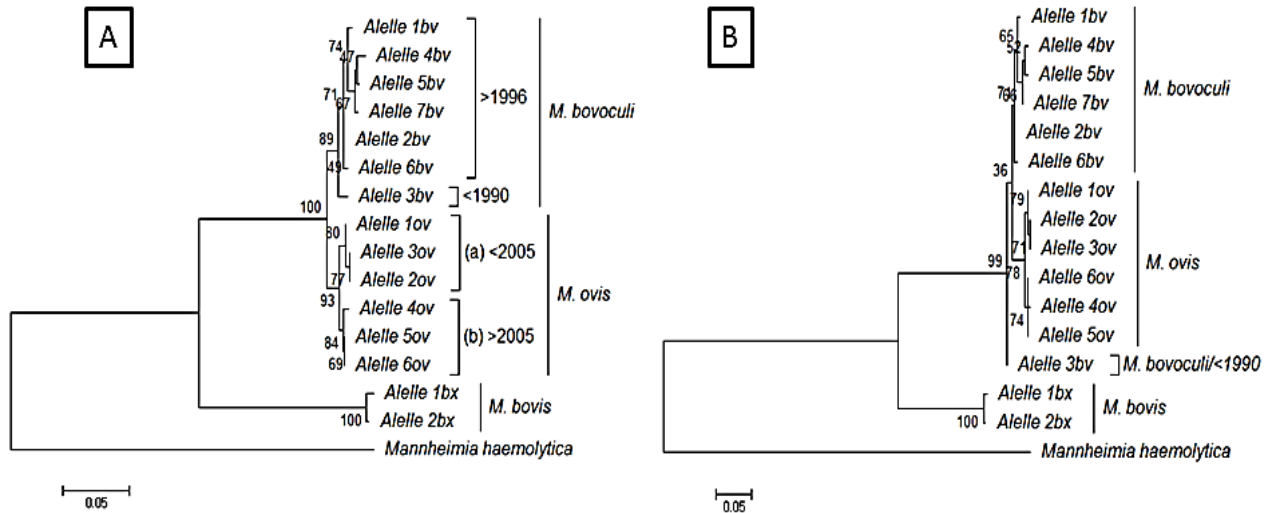


Fig. 1 Phylogenetic analysis of 3' region of cytotoxin (*mbxA*, *mbvA*, *movA*) of *Moraxella* spp. strains was performed with MEGA 6, using 277 amino acid positions. Only bootstrap values higher than 50% of 1000 were displayed. (A) the evolutionary history was estimated by the neighbour-joining method based on the p-distance model. The tree contains two main branches, in one branch are the *M. bovis* alleles (1bx and 2bx alleles), while another branch was separated between *M. bovoculi* alleles (1bv, 2bv, 3bv, 4bv, 5bv, 6bv and 7bv alleles) and *M. ovis* (1ov, 2ov, 3ov, 4ov, 5ov and 6ov alleles). The *M. ovis* strains were still divided according to the year of isolation: (a) strains isolated before or in 2005, (b) strains isolated after 2007. (B) the evolutionary history was estimated by the likelihood method based on Whalen e Goldman (WAG) model (2001). The tree also originated two main branches, in one branch are the *M. bovis* alleles, whereas another branch contains the older *M. bovoculi* allele (3bv allele, strains isolated before 1990), the remaining alleles of *M. bovoculi* and the *M. ovis*. Similarly, *M. ovis* strains according to the year of isolation.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espécies do gênero *Moraxella* estão envolvidas de alguma forma na ceratoconjuntivite infecciosa (CI), acometendo ruminantes, principalmente bovinos. Embora não seja uma doença fatal, a CI é extremamente contagiosa e tem recebido considerável atenção devido a sua distribuição mundial e aos prejuízos econômicos causados. Historicamente, *Moraxella bovis* é a principal espécie envolvida na CI e até o momento, a única para a qual os postulados de Koch foram estabelecidos satisfatoriamente. Os pili tipo IV (Tfp), que ocasionam a aderência microbiana à superfície da célula do hospedeiro, e a secreção da citotoxina (MbxA) com propriedades hemolítica e leucotóxica são os principais fatores de virulência associados a *M. bovis*. Esses fatores de virulência também são tidos como imunógenos e muitas vezes desempenham este papel em vacinas comerciais ou pesquisas vacinais. Contudo, há muito existe a incerteza da eficácia de vacinas/bacterinas comerciais no controle da CI. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar análises genotípicas e filogenéticas em isolados de *M. bovis*, com base nos genes das proteínas tidas como principais fatores de virulência e que também possuem características imunogênicas, ou seja, a Tfp e a MbxA, procurando identificar as diferenças genéticas determinantes para classificação das cepas de *M. bovis*. Ainda, foram analisados os genes da citotoxina de isolados de *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi* relacionados à CI em bovinos e ovinos.

De acordo com a literatura, os isolados de *M. bovis* são classificados em sete sorogrupos (de A até G) com base na variação antigênica verificada por meio de testes sorológicos realizados entre os pili de cepas de determinadas partes do mundo. Além da variação antigênica, cada isolado dispõe de um mecanismo de variação de fase, no qual um sistema de inversão orquestra a variação de fase entre dois genes de pilina, chamados de *tfpQ* e *tfpI*. Os isolados de *M. bovis*, fazendo uso desses mecanismos, podem dispor de um arsenal bastante numeroso de Tfp e evadir o sistema imune, mesmo em animais vacinados. Por outro lado, o que se sabe sobre o gene MbxA é que este é flanqueado por genes responsáveis pela sua ativação e secreção, formando o operon RTX, provavelmente uma ilha de patogenicidade somente vista nas cepas consideradas patogênicas. Ademais, um único estudo comparou a sequência de aminoácidos deduzidos de MbxA entre cepas de *M. bovis* oriundas de diferentes áreas geográficas dos Estados. Contudo, o operon RTX também foi identificado em uma cepa de *M. ovis* (ATCC 33078) e uma cepa de *M. bovoculi* 237 (=ATCC BAA-1259T).

O presente estudo foi incitado pela necessidade de se obter maiores informações a respeito de isolados de *M. bovis*, e por assim dizer também de isolados de *M. bovoculi* e *M. ovis*, circulantes na América do Sul. Afinal, a ceratoconjuntivite infecciosa é uma enfermidade presente nos países que compõem o MERCOSUL (Cone Sul), tendo sido inclusive tema de pesquisa realizada em parceria entre Brasil, Uruguai e Argentina, exatamente pela dificuldade encontrada no controle da doença.

No estudo da região 3' do gene *tfp* analisado entre os isolados de campo, as cepas vacinais e as cepas de referência (dentre as quais estavam as cepas protótipos dos sete sorogrupos) foi possível fazer uma distinção dentro da espécie *M. bovis*. A maioria dos isolados de campo e as cepas vacinais puderam ser agrupadas com as cepas protótipos dos sorogrupos, mostrando ao mesmo tempo variabilidade, mas relativa limitação antigênica. Contudo, foram formados grupos sem a presença das cepas protótipo, sugerindo a existência de isolados que não se encaixam no perfil antigênico até agora estabelecidos. Além disso, a análise empreendendo apenas a subunidade denominada região D também foi verificada entre os isolados e as cepas de *M. bovis*. Em estudos realizados em cepas patogênicas de humanos que também possuem Tfp, a região D foi estabelecida como a estrutura que forma a superfície dos pili e que, por tanto, é responsável pela ligação com o receptor na célula do hospedeiro. Tanto a análise da região C-terminal quanto apenas da subunidade região D mostram que existem isolados que expressão Tfp que talvez não sejam cobertos pela proteção induzida pelas cepas vacinais.

Os Tfp dos isolados de campo que não mostraram similaridade suficiente para agruparem com as cepas protótipos dos sorogrupos foram SB24/90I e Q, SB234/93I e Q, 85/327I, PH02I, PH08Q e TorresQ, assim como o TfpI da cepa vacinal PH07. Neste estudo não foram encontrados isolados oriundos do Brasil agrupados nos grupos B e H, nos quais apenas cepas originárias da Argentina e do Uruguai foram agrupadas.

Por outro lado, as regiões 3' dos genes da citotoxina aqui analisadas, são conservadas e permitem a diferenciação entre as espécies bacterianas, podendo ser utilizadas na classificação filogenética das espécies do gênero *Moraxella* de interesse veterinário. Assim como foi verificado entre os isolados de *M. bovis* oriundos da América do Norte, no presente estudo com isolados de *M. bovis* originários da América do Sul também as sequências de nucleotídeo e aminoácido deduzido mostraram alto grau de conservação, inclusive em relação aos isolados Norte Americanos. Quanto aos isolados de *M. bovoculi* e *M. ovis*, as sequências da região 3' do gene da citotoxina permitiu a distinção entre ambos, embora apresentem alto nível de similaridade. O mesmo alto nível não é verificado entre essas duas espécies e os

isolados de *M. bovis*, embora a literatura ainda considere alta similaridade. Em adição, aparentemente as cepas mais antigas de *M. bovoculi* mostraram maior similaridade com os isolados de *M. bovis* que as demais e os isolados de *M. ovis* parecem poder ser agrupados conforme o período em que foram isolados.

Assim, pretende-se que os resultados aqui encontrados possam auxiliar na caracterização dos Tfp tipo Q e I e da citotoxina dos isolados de *M. bovis*, assim como sobre qualquer papel de *M. bovoculi* na patogênese da CI. Estes esclarecimentos devem ajudar a orientar os esforços futuros para desenvolver melhores vacinas contra CI nos bovinos.

REFERÊNCIAS

- AAS, F.E. et al. Substitutions in the N-terminal alpha helical spine of *Neisseria gonorrhoeae* pilin affect type IV pilus assembly, dynamics and associated functions. **Molecular Microbiology**, v.63, n.1, p.69-85. Jan. 2007.
- 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, Nov. 2010.
- ALLEN, J.L.; GEORGE, L.W.; WILLITS, N.H. Effect of penicillin or penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.206, n.8, p. 1200-1203, Apr. 1995.
- ANDERSEN, C.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V. Chunnel vision. Export and efflux through bacterial channel tunnels. **EMBO Reports**, v.1, n.4, p.313-318, Oct. 2000.
- ANGELOS, J.A. et al. Randomized controlled field trial to assess efficacy of a *Moraxella bovis* pilin-cytotoxin-*Moraxella bovoculi* cytotoxin subunit vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.73, n.10, p.1670-1675, Oct. 2012.
- 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, n.4, p.789-795, Apr. 2007a.
- ANGELOS, J.A. et al. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin-*Moraxella bovis* cytotoxin-ISCAM matrix adjuvanted vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.125, n.3-4, p.274-283. Dec. 2007b.
- ANGELOS, J.A. et al. Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCAM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Research Communications**, v.34, n.3, p.229-239. Mar. 2010.
- ANGELOS, J.A. *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Cause or Coincidence? **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.1, p.73-78, Mar. 2010a.

ANGELOS, J.A. *Moraxella*. In: Gyles, C.L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, 4th Edition, Iowa:Blackwell Publishing, 2010. Cap. 24, p.469-481, 2010b.

ANGELOS, J.A.; BALL, L.M. Relatedness of cytotoxins from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.382-386, 2007a.

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 Veterinary Diagnostic and Investigation**, v.23, n.3, p.552-555, May 2011.

ANGELOS, J.A.; BALL, L.M.; HESS, J.F. Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. **Veterinary Microbiology**, v.125, n.1-2, p.73-79, Nov. 2007c.

ANGELOS, J.A.; HESS, J.F.; GEORGE, L.W. An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. **Veterinary Microbiology**, v.92, n.4, p.363-377, Apr. 2003.

ANGELOS, J.A.; HESS, J.F.; GEORGE, L.W. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.8, p.1222-1228, Aug. 2001.

ANGELOS, J.A.; HESS, J.F.; GEORGE, L.W. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with are combinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. **Vaccine**, v.23, n.4, p.537-545, Dec. 2004.

ANGELOS, J.A.; BALL, L.M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.5, p.532-534, Sep. 2007b.

ANNUAR, B.O.; WILCOX, G.E. Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. **Research in Veterinary Science**, v.39, n.2, p.241-246, Sep. 1985.

ATWELL, J.L. et al. Characterization of Pilin Genes from Seven Serologically Defined Prototype Strains of *Moraxella bovis*. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.16, p.4875-4882, Aug. 1994.

BANKEMPER, K.W. et al. Keratoconjunctivitis associated with *Neisseria ovis* infection in a herd of goats. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v.2, p.76-78, Jan. 1990.

BAPTISTA, P.J.H.P. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **British Veterinary Journal**, v.135, n.12, p.225-242, Aug. 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.

BEARD, M.K.; MOORE, L.J. Reproduction of bovine keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.42, n.1, p.15-33, Sep. 1994.

BERTHOUD, H.; FREY, J.; KUHNERT, P. Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*. **Veterinary Microbiology**, v.87, n.2, p.159-174, Jun. 2002.

BIAIS N. et al. Force-dependent polymorphism in type IV pili reveals hidden epitopes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 25, p.11358-11363, Jun. 2010.

BIEBER, D. et al. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.280, n. 5372, p.2114-2118, Jun. 1998.

BILLINGS, E. Keratitis contagiosa in cattle. **Bulletin of the Agricultural Experiment Station of Nebraska**, v.3, p.247-252, 1889

BILLSON, F.M. et al. A haemolytic cell-free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against infectious bovine keratoconjunctivitis. **FEMS Microbiology Letters**, v.124, n.1, p.69-74, Nov. 1994.

BILLSON, F.M. et al. Characterization of hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysis-neutralizing monoclonal antibody. **Infection and Immunity**, v,68, n.6, p.3469-3474, Jun. 2000.

BOSCH, A. et al. Type-IV pili spectroscopic markers: Applications in the quantification of piliation levels in *Moraxella bovis* cells by a FT-IR ANN-based model. **Journal of Biophotonics**, v.3, n.8-9, p.522-533, Aug. 2010.

BØVRE, K. Family VIII. *Neisseriaceae* Prevot 1933, 119AL, p.288-309. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v.1. Baltimore:Williams & Wilkins Co., 1984.

BØVRE, K. Proposal to Divide the Genus *Moraxella* Lwoff 1939 emend. Henriksen and Bøvre 1968 into Two Subgenera, Subgenus *Moraxella* (Lwoff 1939) Bøvre 1979 and Subgenus *Branhamella* (Catlin 1970) Bøvre 1979. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.29, n.4, p.403-406, Oct. 1979.

BØVRE, K.; FRØHOLM, L.O. Variation of colony morphology reflecting fimbriation in *Moraxella bovis* and two reference strains of *M. nonliquefaciens*. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica B Microbiology and Immunology**, v.80B, n.5, p.629-640, Sep. 1972.

BROWN, M.H. et al. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.12, n.4, p.259-266, Jul-Aug. 1998.

BURROWS, L.L.; LO, R.Y. Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. **Infection and Immunity**, v.60, n.6, p.2166-2173, Jun. 1992.

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, Jan. 2008.

CALCUTT, M.J. et al. Draft genome sequence of *Moraxella bovoculi* strain 237T (ATCC BAA-1259T) isolated from a calf with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Genome Announcements**, v.2, n.3, p.1-2, May/June. 2014.

CATLIN, B.W. *Branhamaceae* fam. nov., a proposed family to accommodate the genera *Branhamella* and *Moraxella*. **International journal of systematic bacteriology**, v.41, n.2, p.320-323, Apr. 1991.

CATRY, 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, n.3-4, p.375-380, Mar 2007.

CERNY, H E. et al. Effects of *Moraxella (Branhamella) ovis* culture filtrates on bovine erythrocytes, peripheral mononuclear cells, and corneal epithelial cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.3, p.772-776, Mar. 2006.

CHANDLER, R.L.; SMITH, M.D.; 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, Apr. 1981.

CHANG, Y.F.; YOUNG, R.; STRUCK, D.K. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. **Dna**, v.8, n.9, p.635-647, Nov. 1989.

CHAVES, N.S.T.; LIMA, A.M.V.; AMARAL, A.V.C. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa em ovinos causada por *Moraxella* spp. no estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.256-261, Jan./Mar. 2008.

CHUNG, I.Y. et al. A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, n.31, p.11503-11508, Jul. 2014.

CLINKENBEARD, K.D.; THIESSEN, A.E. Mechanism of action of *Moraxella bovis* hemolysin. **Infection and Immunity**, v.59, n.3, p.1148-1152, Mar. 1991.

CONCEIÇÃO, F.R. et al. Antigenic relationships of *Moraxella bovis* isolates recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil, and Uruguay between 1983 and 2000. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.67, n.4, p.315-318, Oct. 2003.

CONCEIÇÃO, F.R. et al. Molecular diversity of *Moraxella bovis* isolated from Brazil, Argentina and Uruguay over a period of three decades. **The Veterinary Journal**, v.167, n.1, p.53-58, Jan. 2004.

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, Jul./Ago. 2003.

COUREUIL, M. et al. Mechanism of meningeal invasion by *Neisseria meningitidis*. **Virulence**, v.3, n.2, p.164-172, Apr. 2012.

CRAIG, L.; LI, J. Type IV pili: paradoxes in form and function. **Current Opinion in Structural Biology**, v.18, n.2, p.267-277, Apr. 2008.

CRAIG, L.; PIQUE, M.E.; TAINER, J.A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.363-378, May 2004.

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, Jan./Feb. 1994.

DILEEPAN, T. et al. Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Infection and Immunity**. V.75, p.4851-4856, Jul. 2007.

DUBAY, S.A. Association of *Moraxella ovis* with keratoconjunctivitis in mule deer and moose in Wyoming. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, n.2, Apr. 2000.

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, n.4, p.560-563, Feb. 1998.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.5, p.1792-1797, Mar. 2004.

EGERTON, J.R. et al. Protection of sheep against foot rot with a recombinant DNA-based fimbrial vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.14, n.4, p.393-409, Sep. 1987.

ELAD, D.; YERUHAM, I.; BERNSTEIN, M. *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). **Israel. Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v.35, n.1-10, p.431-434, Jan./Dec. 1988.

ELLEMAN et al. Characterization of the pilin gene of *Moraxella bovis* Dalton 2d and expression of pili from *M. bovis* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v.58, n.6, p.1678-1684, Jun. 1990.

EMAM, A. et al. Laboratory and clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains do not bind glycosphingolipids in vitro or during type IV pili mediated initial host cell attachment. **Microbiology**, v.152, n.9, p.2789-2799, Sep. 2006.

EUZÉBY, J.P. Nomenclature of the subgenera *Moraxella* and *Branhamella* and of the nine species included in these subgenera and proposal to modify Rule 34a of the Bacteriological Code (1990 Revision). Request for an Opinion. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.51, n.5, p.1939-1941, Sep. 2001.

FAIRLIE, G. The isolation of a haemolytic *Neisseria* from cattle and sheep in the North of Scotland. **Veterinary Record**, v.78, p.649-650, 1966.

FARN, J.L. et al. Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.22, p.6717-6720, Nov. 2001.

FISHER, M.A. et al. Use of a polymerase chain reaction method to detect the leukotoxin gene *lktA* in biogroup and biovariant isolates of *Pasteurella haemolytica* and *P. trehalosi*. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.11, p.1402-1406. Nov. 1999.

FRANK, S.K.; GERBER, J.D. Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, n.2, p.269-271, Feb 1981.

FREY, J. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae* – Review. *Veterinary Microbiology*, v.153, n.1-2, p.51-58, Nov. 2011.

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, Dec. 1975.

FRØHOLM, L. O.; SLETTEN, K. Purification and N-terminal sequence of a fimbrial protein from *Moraxella nonliquefaciens*. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, v.73, n.1, p.1929. Jan. 1977.

FULKS, K.A. Sequence Analysis of the Inversion Region Containing the Pilin Genes of *Moraxella bovis*. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.1, p.310-316, Jan. 1990.

GEORGE, L.W. et al. Enhancement of infectious bovine keratoconjunctivitis by modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.11, p.1800-1806, Nov. 1988.

GEORGE, L.W.; ANGELOS, J.A.; RUEHL, W.W. Stability, antigenicity, and aggregation of *Moraxella bovis* cytolysin after purification and storage. **American Journal of Veterinary Research**, 65, n.7, p.977-983, Jul. 2004.

GEORGE, L.W.; BORROWMAN, A.J.; ANGELOS, J.A. Effectiveness of a cytolysin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.136-142, 2005.

GILTNER, C.L.; NGUYEN, Y.; BURROWS, L.L. Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v., 76, n.4, p.740-772 Dec. 2012.

- GILTNER, C.L. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. **Molecular Microbiology**, v.59, n.4, p.1083-1096, Feb. 2006.
- GIL-TURNES, C. Ceratoconjuntivite bovina infecciosa. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doença de ruminantes e equinos**. Santa Maria: Pallotti, p.267-278, 2007.
- GIL-TURNES, C. Hemagglutination, autoagglutination and pathogenicity of *Moraxella bovis* strains. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.47, n.4, p.503-504, Oct. 1983.
- GIL-TURNES, C.; ALBUQUERQUE, I.M. Serotypes and antibiotic sensitivity of *Moraxella bovis* isolated from an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.48, n.4, p.428-430, Oct. 1984.
- 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, n.1-2, p.108-115, May 2013.
- GRAY, J.T.; FEDORKA-CRAY, P.J.; ROGERS, D.G. Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytolysin. **Veterinary Microbiology**, v.43, n.2-3, p.183-196. Feb. 1995.
- GREENE, W.H.; GRUBBS, S.T.; POTGIETER, L.N. Detection of shared antigenic determinants on whole *Moraxella bovis* pili by use of antisera to cyanogen bromide-cleaved *M. bovis* pilus protein. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.8, p.1279-1284, Aug. 2001a.
- GREENE, W.H.; GRUBBS, S.T.; POTGIETER, L.N. Immunoblot analysis of cyanogen bromide-cleaved *Moraxella bovis* pilin reveals presence of shared antigenic determinants on pili from heterologous strains. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.4, p.365-372, Jun. 2001b.
- HAAS, R.; SCHWARZ, H.; MEYER, T.F. Release of soluble pilin antigen coupled with gene conversion in *Neisseria gonorrhoeae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, n.24, p.9079-9083, Dec. 1987.
- HAGBLOM, P. et al. Intragenic recombination leads to pilus antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. **Nature**, v.315, p.156-158, May 1985.
- HAHN, H.P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*—a review. **Gene**, v.192, n.1, p.99-108, Jun. 1997.

HAZES, B. et al. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. **Journal of Molecular Biology**, v.299, n.4, p.1005-1017, Jun. 2000.

HENRICHSEN, J.; FRØHOLM, L.O.; BØVRE K. Studies on bacterial surface translocation. 2. Correlation of twitching motility and fimbriation in colony variants of *Moraxella nonliquefaciens*, *M. bovis*, and *M. kingii*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica-Section B: Microbiology & Immunology**, v.80, n.3, p.445-452, 1972.

HENRIKSEN, S.D.; BØVRE K.. The taxonomy of the genera *Moraxella* and *Neisseria*. **Journal of General Microbiology**, v.51, n.3, p.387-392, May 1968.

HEINRICH, D.W.; GLASGOW, A.C. Transcriptional Regulation of Type 4 Pilin Genes and the Site-Specific Recombinase Gene, piv, in *Moraxella lacunata* and *Moraxella bovis*. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.23, p.7298-7305, Dec. 1997.

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

HERMODSON, M.A.; CHEN K.C.S.; BUCHANAN, T.M. *Neisseria* pili proteins: amino terminal amino acid sequences and identification of an unusual amino acid. **Biochemistry**, v.17, n.3, p.442, Feb. 1978.

HESS, J.F.; ANGELOS, J.A. The *Moraxella bovis* RTX toxin locus mbx defines a pathogenicity island. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, n.4, p.443-449, Apr. 2006.

HOIEN-DALEN, P.S.; ROSENBUSCH, R.F.; ROTH J.A. Comparative characterization of the leukocidic and hemolytic activity of *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, n.2, p.191-196, Feb. 1990.

HORZEMPA, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycosylation: glycan substrate recognition. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.12, p.4244-4252, Jun. 2006.

JAYAPPA, H.G.; LEHR, C. Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of *Moraxella bovis* in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.10, p.2217-2221, Oct. 1986.

JONES, F.S.; LITTLE, R.B. An infectious ophthalmia of cattle. **Journal of Experimental Medicine**, v.38, n.2, p.139-148, Jul. 1923.

JONSSON, A.B. et al. Sequence changes in the pilus subunit lead to tropism variation of *Neisseria gonorrhoeae* to human tissue. **Molecular Microbiology**, v.13, n.3, p.403-416, Aug. 1994.

KAGONYERA, G.M.; GEORGE, L.W.; MUNN, R. CYTOPATHIC effects of *Moraxella bovis* on cultured bovine neutrophils and corneal epithelial cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.1, p.10-7. Jan.1989.

KAKUDA, T.; SARATAPHAN, N.; TANAKA, T.; TAKAI, S. Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.118, n.1-2, p.141-147, Nov. 2006.

KELLEY, L.A.; STERNBERG, M.J.E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v.4, n.3, p.363-371, Feb. 2009.

KILLINGER, A.H. et al. Economic impact of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician.**, v.72, n.4, p.618-20, Apr 1977

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**, v.41, n. 5, p.336-343, Jul.1994.

KORONAKIS, V. et al. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. **Nature**, v.405, p.914-919, 2000.

KORONAKIS, V. et al. The HlyB/HlyD-dependent secretion of toxins by gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Immunology**, v.5, n.1-3, p.45-53, Sep. 1992.

KUHNERT, P. et al. Characterization of PaxA and its operon: a cohemolytic RTX toxin determinant from pathogenic *Pasteurella aerogenes*. **Infection and Immunity**, v.68, n.1, p.6-12, Jan. 2000.

KUHNERT, P.; SCHLATTER, Y.; FREY, J. Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in *Actinobacillus porcitonisillarum*. **Veterinary Microbiology**, v.107, n.3-4, p.225-232, May 2005.

LEPPER, A.W.D. et al. A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Microbiology**, v.36, n.1-2, p.175-183. Jul 1993.

LEPPER, A.W.D. et al. The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Microbiology**, v.32, n.2, p.177-187, Sep. 1992.

LEPPER, A.W. Vaccination against infectious bovine keratoconjunctivitis: protective efficacy and antibody response induced by pili of homologous and heterologous strains of *Moraxella bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.65, n.10, p.310-316, Oct. 1988.

LEPPER, A.W.D. et al. The protective efficacy of cloned *Moraxella bovis* pili in monovalent and multivalent vaccine formulations against experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). **Veterinary Microbiology**, v.45, n.2-3, p.129-138, Jul. 1995.

LEPPER, A.W.D.; BARTON, I. J. Infectious bovine keratoconjunctivitis: seasonal variation in cultural, biochemical and immunoreactive properties of *Moraxella bovis* isolated from the eyes of cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.64, n.2, p.33-39, Feb. 1987.

LEPPER, A.W.D.; HERMANS, L.R. Characterization and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. **Australian Veterinary Journal**, v.63, p.401-405, 1986.

LEHR, C.; JAYAPPA, H.G.; GOODNOW, R.A. Serologic and protective characterization of *Moraxella bovis* pili. *Cornell Vet.*, v.75, n.4, p.484-492, 1985.

LIBARDONI, F. et al. *C. Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.8, p.743-746, Aug. 2012.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, n.11, p.1451-1452, Apr. 2009.

LINDQVIST, K. A *Neisseria* species associated with infectious Keratoconjunctivitis of sheep-*Neisseria ovis* NOV. SPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, v.106, n.2, pp. 162-165, Mar/Apr. 1960.

LINHARTOVÁ, I. et al. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. **FEMS Microbiology Reviews**, v.34, n.6, p.1076-1112, Nov. 2010.

LO, R.Y.; STRATHDEE, C.A.; SHEWEN, P.E. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. **Infection and Immunity**, v.55, n.9, p.1987-1996, Sep. 1987.

MARRION, R.M.; RILEY, L.K. Detection of cell detachment activity induced by *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.9, p.1145-1149, Sep 2000.

MARRS, C.F. et al. Cloning and sequencing of a *Moraxella bovis* pilin gene. **Journal of Bacteriology**. v.163, n.1, p.132-139, Jul. 1985.

MARRS, C.F. et al., Pilin-gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.7, p.3032-3039, Jul. 1988.

MATTICK, J.S. et al. Gene sequences and comparison of the fimbrial subunits representative of *Bacteroides nodosus* serotypes A to I: class I and class II strains. **Molecular Microbiology**, v.5, n.3, p.561-573, Mar. 1991.

MATTICK, J.S. Type IV pili and twitching motility. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.289-314, Jan. 2002.

MATTICK J.S.; WHITCHURCH, C.B., ALM, R.A. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. **Gene**, v.179, n.1, p.147-155, Apr. 1996.

MAYOR, D. et al. Distribution of RTX toxin genes in strains of [*Actinobacillus*] *rossii* and [*Pasteurella*] *mairii*. **Veterinary Microbiology**, v.116, n.1-3, p.194-201, Aug. 2006.

McCONNEL, C.S.; HOUSE, J.K. Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccine development. **Australian Veterinary Journal**, v.83, n.8, p.506-510 Aug. 2005.

McCONNEL, C.S. et al. Serologic cross-reactivity of Australian *Moraxella bovis* to vaccinal bacterin strains as determined by competitive ELISA. **Australian Veterinary Journal**, v.86, n.4, Apr. 2008.

McMICHAEL, J. Bacterial differentiation within *Moraxella bovis* colonies growing at the interface of the agar medium with the Petri dish. **Journal of General Microbiology**, v.138, n.12, p.2687-2695, Dec. 1992.

MEKALANOS, J.J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.1, p.1-7, Jan. 1992.

MENA-ROJAS, E. et al. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-kDa putative RTX protein. **FEMS Microbiology Letters**. v.232, n.1, p.83-87, Mar. 2004.

MERZ, A.J.; SO, M. Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.16, p.423-57, Nov. 2000.

MCKERN, N.M. et al. Amino acid sequences of pilin from *Bacteroides nodosus* (strain 198), the causative agent of ovine footrot. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, v.164, n.1, p.149-153, Nov. 1983.

MOORE, L.J.; LEPPER, A.W.D. A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.29, n.1, p.75-83, Sep. 1991.

MOORE, L.J.; RUTTER, J.M. Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.11, p.2063-2070, Nov. 1987.

NADALINI, G. et al. *Neisseria ovis* em ovinos. **Revista de Ciências Biomédicas**, v.12, p.61-67, 1991.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, v.3, n.5, p.418-426, 1986.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York:Oxford University Press, 2000, 333p.

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, n.2-4, p.374-380, Mar. 2012.

OSTLE, A.G.; ROSENBUSCH, R.F. Immunogenicity of *Moraxella bovis* hemolysin. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.5, p.1011-1014, May 1985.

PARGE, H.E. et al. A. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. **Nature**, v.378, p.32-38, Nov. 1995.

PEARCE, J.; MOORE, C.P. Food animal ophthalmology. In: GELATT, K.; GILGER, B.C.; KERN, T.J. **Veterinary Ophthalmology**. v.2, 5th ed. Iowa:Wiley-Blackwell, 2013, 2260p. p.1610-1614, chap. 29, 2013.

PEDERSEN, K.B. The origin of immunoglobulin-G in bovine tears. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology**, v.81B, n.2, p.245-252, Sep. 1973.

PEDERSEN, K.B.; FRØHOLM, L.O.; BØVRE, K. Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival colonisation and development of keratoconjunctivitis in cattle. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology**; v.80B, n.6, p.911-918, Sep. 1972.

PELICIC, V. Type IV pili: e pluribus unum? **Molecular Microbiology**, v.68, n.4, p.827-837, May 2008.

PETTERSSON, B. et al. Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16S rRNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.75-89, Jan. 1998.

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v.24, n.124, p.715-727, Feb. 2006.

POSTMA, G.C.; CARFAGNINI, J.C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious disease**, v.31, n.6, p.449-458, Nov. 2008.

PRIETO, C.I.; AGUILAR, M.O.; YANTORNO, O.M. Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v.70, n.3-4, p.213-223, Dec. 1999.

PRIETO, C.I. 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, Oct. 2013.

PRIETO, C.I. et al. Vaccine against infectious bovine keratoconjunctivitis: A new approach to optimize the production of highly piliated *Moraxella bovis* cells. **Vaccine**, v.26, n.51, p.6542-6549, Oct. 2008.

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, n.11, p.2343-2345, Nov. 1986.

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, Oct. 1970.

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, Apr. 1968

PUGH, G.W. JR., HUGHES, D. E. Experimental production of infectious bovine keratoconjunctivitis: comparison of serological and immunological responses using pili fractions of *Moraxella bovis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.40, n.1, p.60-66, Jan 1976.

RODRÍGUEZ, M.E. et al. Effect of hydromechanical forces on the production of filamentous haemagglutinin and pertussis toxin of *Bordetella pertussis*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, n.2, p.103-108, Feb. 1993.

RODRÍGUEZ, M.E.; HOZBOR, D.F.; YANTORNO, O.M. Effect of hydromechanical stress on cellular antigens of *Bordetella pertussis*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.17, n.1, p.53-55, Jul. 1996.

ROSE, T. et al. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. **Journal of Biological Chemistry**, v.70, n.44, p.26370-26376, Sep. 1995.

ROSSAU, R. et al. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and deoxyribonucleic acid homologies of *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysiella*, and Centers for Disease Control groups EF-4 and M-5 in the emended family *Neisseriaceae*. **International journal of systematic bacteriology**, v.39, n.2, p.185-198, Apr. 1989.

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, Apr. 1991.

ROZSA, F.W.; MARRS C.F. Interesting Sequence differences between the pilin gene inversion regions of *Moraxella lacunata* ATCC 17956 and *Moraxella bovis* Epp63. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.13, p. 4000-4006, Jul.1991.

RUEHL, W.W. et al. Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. **Journal of Experimental Medicine**, v.168, n.3, p.983-1002, Sep. 1988.

RUEHL, W.W. et al. Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas *in vitro*. **Molecular Microbiology**, v.7, n.2, p.285-288, Jan. 1993a.

RUEHL, W.W. et al. Infection rates, disease frequency, pilin gene rearrangement, and pilin expression in calves inoculated with *Moraxella bovis* pilin-specific isogenic variants. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.2, p.248–253, Feb. 1993b.

RYTKONEN, A. et al. Soluble pilin of *Neisseria gonorrhoeae* interacts with human target cells and tissue. **Infection and Immunity**, v.69, n.10, p.6419-26, Oct. 2001.

SASTRY, P.A. et al. Comparative studies of the amino acid and nucleotide sequences of pilin derived from *Pseudomonas aeruginosa*. PAK and PAO. **Journal of Bacteriology**. v.164, n.2, p.571-577, Nov. 1985.

SATCHELL, K.J.F. Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins. **Annual Review of Microbiology**, v.65, p.71-90, Oct. 2011.

SCHEUERPFUG, I. et al. Roles of PilC and PilE proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.67, n.2, p.834-843, Feb. 1999.

SIMMS, D. et al. Results of a production analysis survey of cow herds in Kansas. Cattlemen's Day (Conference), **Kansas State University**, p.128-131, Mar. 1993.

SIMPSON, C.F.; WHITE, F.H.; SANDHU, T.S. The Structure of Pili (Fimbriae) of *Moraxella bovis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.40, p.1-4, Jan. 1976.

SKERKER, J.M.; BERG, H.C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.12, p.6901-6904, Jun. 2001.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved Lists of Bacterial Names. **International journal of systematic bacteriology**, v.30, p.225-420, 1980.

SLATTER, D.H. et al. A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, v.59, n.3, p.65-68, Sept. 1982 a.

SLATTER, D.H. et al. A national survey of clinical features, treatment and importance of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, v.59, n.3, p.69-72, Sep. 1982b.

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, n.3, p.507-518, Mar. 2005.

SOSA, V.; ZUNINO, P. Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.7, n.11, p.819-824, Nov. 2013.

SPRADBROW, P. Experimental infection of the ovine cornea with *Neisseria ovis*. **Veterinary Record**, v.88, n.23, p.615-616, Jun. 1971.

STADEN, R. The staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v.5, n.3, p.1596-1599, 1996.

STANLEY, P. et al. Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. **Science**, v.266, n. 5193, p.1992-1996, Dec. 1994.

STRATHDEE, C.A., LO, R.Y. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. **Journal of Bacteriology**, v.171, n.2, p.916-928, Feb. 1989.

STROM, M.S.; LORY, S. Amino acid substitutions in pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptide cleavage, amino-terminal methylation, and pilus assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.3, p.1656-1664, Jan. 1991.

STROM, M.S.; LORY, S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.565-596, 1993.

SUN, H.; ZUSMAN, D.R.; SHI, W. Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the frz chemosensory system. **Current Biology**, v.10, n.18, p.1143-1146, Sep. 2000.

TAHA, M.K. et al. Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. **Molecular Microbiology**, v.28, n.6, p.1153-1163, Jun. 1998.

TAMURA, K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, p.2725-2729, Oct. 2013.

TAYLOR, R.K. et al. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, n.9, p.2833-2837, May 1987.

THRIFT, F.A.; OVERFIELD, J.R. Impacto of pinkeye (infectious bovine keratoconjunctivitis) on weaning and postweaning performance of Hereford calves. **Journal of Animal Science**, v.38, n.6, p.1179-1184, Jun. 1974.

TINDALL, B.J. Challenging Opinion 83. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.58, n.4, p.1772-1774, Jul. 2008.

TROUTT, H. F.; SCHURIG G.D. Pinkeye. **Animal Nutrition and Health**, p.38-41, Feb. 1985.

VAN HALDEREN, A.; HENTON, M.M. *Moraxella* spp.infection. In: HIRSH, D.C.; MACLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L. **Veterinary microbiology**. 2nd ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. 1605p. p.1033-1037, chap. 120, 2004.

VIRJI, M.; HECKELS, J.E. The role of common and typespecific pilus antigenic domains in adhesion and virulence of gonococci for human epithelial cells. **Journal of general microbiology**, v.130, n.5, p.1089-1095 May 1984.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.12, p.4776-4780, Jun. 1990.

WARD, J.K.; NEILSON, M.K. Pinkeye (bovine infectious keratoconjunctivitis) in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.49, p.361-366, 1979.

WATT, J.A. Bovine keratitis associated with *Moraxella (Haemophilus) bovis*. **Veterinary Record**, v.63, n.6, p.98, 1951.

WELCH, R. A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. **Current topics in microbiology and immunology**, v.257, p.85-111, 2001.

WEYAND, N.J. et al. Monoclonal antibody detection of CD46 clustering beneath *Neisseria gonorrhoeae* microcolonies. **Infection and Immunity**, v.74, n.4, p.2428-2435, Apr. 2006.

WHELAN, S.; GOLDMAN, N. A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.5, p.691-699, May 2001.

WILCOX, G.E. An examination of *Moraxella* and related Genera commonly isolated from the bovine eye. **Journal of Comparative Pathology**, v.80, n.1, p.65-74, Jan. 1970.

WINTHER-LARSEN, H.C. et al. *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.6, p.15276-15281, Dec. 2001.

YANG, Z. et al. Alanine 32 in PilA is important for PilA stability and type IV pili function in *Myxococcus xanthus*. **Microbiology**, v.157, n.7, p.1920-1928. Jul. 2011.

YU, R.H.; SCHRYVERS, A.B. Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. **Biochemistry and Cell Biology**, v.80, n.1, p.81-90, 2002.

APÊNDICES

Apêndice A – Nível de similaridade entre as sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácido deduzidos (aa) da região 3` do gene *pili* tipo IV (subdomínio α -1C N-terminal e domínio C-terminal) dos isolados de campo e das cepas vacinais e de referência de *Moraxella bovis*.

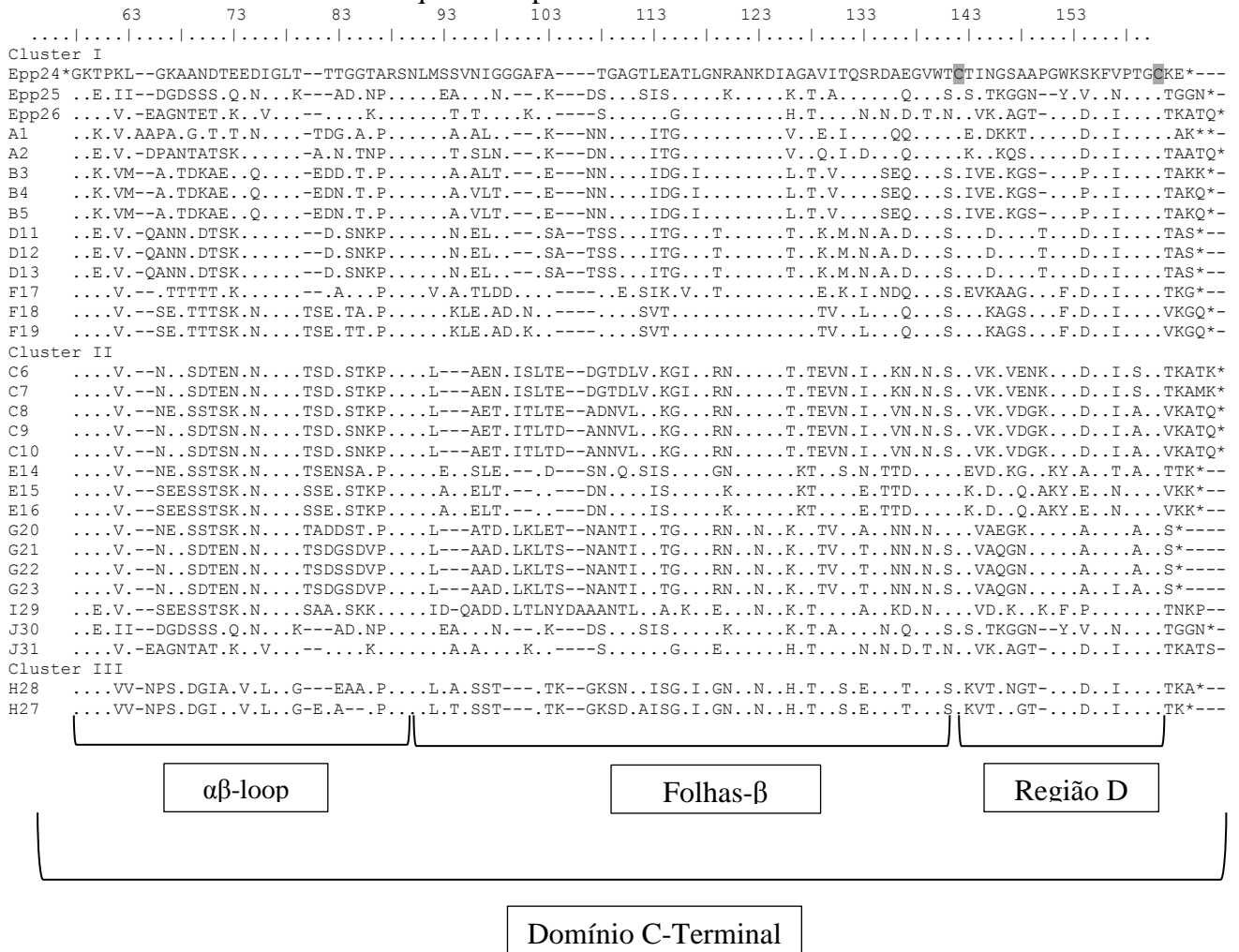
nt/aa	Identity (%)																														
	A*	A	B	B	B	C	C	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F	F	F	G	G	G	G	Epp	Epp	Epp	H	H	I	J	J
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
A1	100	82.6	77.5	77.5	77.7	65	65.2	66.8	64.7	65	73.5	74	73.7	73.3	71.5	71.2	73.9	69.8	70.3	70.6	67.4	66.9	67.4	75.5	71.9	73.5	65.9	65.1	65.2	67.3	67.6
A2	79.5	100	73	74	74.3	66.4	66.4	67.9	66.2	66.4	74.6	75.1	74.8	71.5	71	70.7	74.1	69.4	70.2	69.3	65.4	65.1	65.4	73.1	74.7	77.0	67.2	65.9	65.9	68.8	69.1
B3	76.2	66.4	100	97.5	97.2	63.9	64.1	62.8	63.4	63.1	71.1	70.5	70.3	69.7	68.4	68.2	73.7	66.9	68.2	67.2	65.6	65.1	65.6	73.5	70.6	72.4	66.7	66.1	65.9	66.1	65.8
B4	75.4	67.9	97.7	100	99.7	65.4	65.6	64.4	64.9	64.6	72.1	70.5	70.3	70.5	70	69.7	72.4	67.9	69.2	67.7	65.4	65.6	65.6	73.5	70.8	71.9	66.7	67.2	67.4	65.9	65.6
B5	75.4	67.9	97.7	100	100	65.6	65.9	64.6	64.6	64.9	72.3	70.8	70.5	70.8	70.2	70	72.1	68.2	69	68	65.6	65.9	65.9	73.8	71.1	72.1	66.9	66.9	67.7	66.1	65.9
C6	58	55.6	59.5	59.5	59.5	100	99.5	85.3	87.1	87.3	65.6	64.4	64.1	67.4	65.4	65.2	66.9	69.9	69.2	74.7	78	78.3	78.3	64.8	69.7	69.5	66.9	67.5	69.5	65.1	65.3
C7	58	54.9	59.5	59.5	59.5	99.3	100	85.3	87.1	87.3	65.9	64.6	64.4	67.7	65.7	65.4	67.2	70.2	69.4	74.9	78.3	78.6	78.6	65.1	69.7	69.5	67.2	67.7	69.5	65.3	65.6
C8	59.5	57.9	60.3	60.3	60.3	85.1	84.3	100	95.1	95.3	68.2	67.4	67.2	70.7	67.7	67.9	66.1	70.7	69.9	77.3	73.1	73.4	73.4	67.4	71.5	70.8	66.9	66.9	70.7	65.1	65.3
C9	60.3	57.1	60.3	60.3	60.3	85.8	85.1	95.6	100	99.8	68.7	67.4	67.2	66.9	64.6	65.9	70.7	70.5	73.4	73.4	75.5	75.7	75.7	66.9	71.8	70.8	66.4	66.7	68.4	64.5	64.8
C10	60.3	57.1	60.3	60.3	60.3	85.8	85.1	95.6	100	100	69	67.7	67.4	67.2	64.9	64.6	65.6	71	70.2	73.6	75.7	76	76	67.2	72.1	71.0	66.7	66.4	68.7	64.8	65.1
D11	72.7	74	68.2	67.7	67.7	61.8	61.8	64.1	64.9	64.9	100	98.5	98.2	71	71.5	71.2	71.1	70.5	71.3	69.5	67.2	67.4	67.4	75.3	74.2	75.3	65.6	64	68.5	65.9	66.1
D12	72.7	74	68.2	67.7	67.7	61.8	61.8	64.1	64.9	64.9	100	100	99.7	71.5	71	71.2	71.4	70	71	69.5	67.4	67.4	67.4	75.3	73.4	75.3	67.2	64	67.4	65	65.3
D13	72.7	74	68.2	67.7	67.7	61.8	61.8	64.1	64.9	64.9	100	100	100	71.2	70.7	71	71.1	69.7	70.8	69.3	67.2	67.2	67.2	75.1	73.2	75.0	66.9	63.8	67.2	64.8	65
E14	67.9	64.1	63.1	63.8	63.8	59.8	59.8	63.6	61.4	61.4	65.6	65.6	65.6	100	79.5	79.3	72.4	71.5	72	75.9	70.8	70.8	70.8	72.4	70.3	71.9	68	66.7	69.7	67.5	67.2
E15	66.7	66.7	64.9	64.9	64.9	58.3	58.3	63.6	61.4	61.4	69.5	69.5	69.5	79.5	100	99.7	66.4	72.5	73	69.8	63.8	63.8	64.1	70.5	69.3	68.7	66.4	64	69	68	67.8
E16	66.7	66.7	64.9	64.9	64.9	58.3	58.3	63.6	61.4	61.4	69.5	69.5	69.5	79.5	100	100	66.2	72.2	72.7	69.5	63.6	63.6	63.8	70.3	69.0	68.5	66.7	64.3	68.7	67.8	67.5
F17	72.1	67.7	66.4	66.4	66.4	61.2	61.2	61.2	60.5	60.5	69.5	69.5	69.5	68.2	63.1	63.1	100	74	75	70.1	68.5	68.5	68.5	74.0	73.0	75.6	66.7	66.4	63.5	66.7	66.4
F18	69.5	67.4	61.8	62.6	62.6	62.1	62.1	66.7	65.2	65.2	69.2	69.2	69.2	66.4	68.9	68.9	75	100	98.3	71.6	69.5	69.5	69.5	72.8	71.5	71.5	66.1	63.8	64.1	68.5	68.8
F19	69.5	68.9	63.4	64.1	64.1	62.1	62.1	66.7	64.4	64.4	70	70	70	66.4	70.5	70.5	75.8	97.8	100	70.6	68	68	68	73.5	71.5	72.2	67.5	65.1	64.6	68	68.3
G20	64.1	61.7	59.1	59.1	59.1	70.5	70.5	76.7	73.6	73.6	63.3	63.3	63.3	66.9	62	62	61.9	68	68	100	89.6	89.1	89.1	70.6	66.4	68.0	66.9	66.7	71.9	63.7	64
G21	64.1	57.8	61.4	60.6	60.6	74.4	74.4	74.4	76.7	76.7	62.5	62.5	62.5	63.8	58.1	58.1	61.1	65.6	64.8	88.5	100	99	99.5	68.0	65.9	67.7	65	65	69.3	63.7	64
G22	62.5	57.8	59.8	59.8	59.8	73.6	73.6	73.6	76	76	61.7	61.7	61.7	63.1	58.1	58.1	59.5	64.8	64.1	87.8	98.5	100	98.5	67.5	65.9	67.2	65	64.7	69.5	63.7	64
G23	64.8	58.6	62.2	61.4	61.4	75.2	75.2	75.2	77.5	77.5	63.3	63.3	63.3	63.8	58.1	58.1	61.9	66.4	65.6	87.8	99.2	97.7	100	67.5	66.1	67.7	65	65.3	69	64	64.2
Epp24	76.6	69.8	68.5	68.5	68.5	57.8	57.8	58.6	59.4	59.4	72.4	72.4	72.4	66.4	68.2	68.2	70.2	71	71.8	64.3	63.5	61.9	62.7	100	74.6	78.5	65.9	64.2	68.8	67.8	68
Epp25	69.8	68.9	68	67.2	67.2	63.1	62.3	65.4	64.6	64.6	73.4	73.4	73.4	65.6	65.1	65.1	71.8	66.7	68.2	60	61.6	60	62.4	74.6	100	94.5	67.5	67.5	67.7	71.2	71
Epp26	69.8	71.2	68	68	68	63.8	63.1	66.2	65.4	65.4	74.2	74.2	74.2	66.4	66.7	66.7	72.5	67.4	68.9	61.6	61.6	60	62.4	76.2	95.5	100	69.9	68	66.1	68.5	68.3
H27	60	62.1	65.6	65	65	61.8	61.8	62.6	62.6	62.6	61.6	61.6	61.6	62.6	60.5	60.5	62.1	60.3	61.9	59.5	58.7	57.9	59.5	62.1	66.4	68.0	100	96.1	63.5	64.5	64.8
H28	60.3	60	65	64.5	64.5	60.5	60.5	61.3	61.3	61.3	58.7	58.7	58.7	62.9	56	56	62.4	59.1	59.1	58.7	59.5	58.7	60.3	60.5	65.9	65.9	93.8	100	63	64.5	64.8
I29	59.7	56.9	59.7	59.7	59.7	62.6	62.6	65.6	63.4	63.4	65.1	65.1	65.1	65.4	69.2	69.2	60.2	59.5	60.3	70.3	64.8	64.1	64.1	61.4	62.5	62.5	55.2	54	100	66.9	67.2
J30	65.6	62.6	66.4	65	65	54.8	54.8	54.8	54	54	61.8	61.8	61.8	61.3	64.2	64.2	61.8	61.6	62.4	54.5	56.1	54.5	56.1	64.8	64.5	63.7	57.4	56.6	57	100	99.7
J31	66.4	63.4	66.4	65	65	55.6	55.6	55.6	54.8	54.8	61.8	61.8	61.8	61.3	64.2	64.2	61	62.4	63.2	55.3	56.9	55.3	56.9	65.6	63.7	62.9	58.2	57.4	57.8	99.2	100

* Letters representing groups. numbers represent the alleles. Alleles painted gray indicate *tfpQ/I* gene from vaccine strains.

Alleles in bold indicate *tfp* gene from public database strains (GenBank®)

** Red color intensity indicates the high similarities. Low similarities are indicated by blue color intensity.

Apêndice B – Sequência de amino ácidos deduzidos da região C-terminal do gene pili tipo IV dos isolados de campo e das cepas vacinais e de referência de *Moraxella bovis*. As sequências estão identificadas com letras (grupo) e números (alelo) e estão divididas nos clusters I, II e III. Abaixo é mostrada a divisão quanto às partes do domínio C-terminal.



*Epp24 corresponde a sequência da cepa de referência Epp63.

Apêndice C – Sequência de aminoácidos deduzidos da região C-terminal do gene da citotoxina dos isolados de *M. bovoculi* (bv), *M. ovis* (ov) e *M. bovis* (bx). Cada espécie do Gênero *Moraxella* ainda está dividida em alelos.

Alelo	613	623	633	643	653	663	673	683	693								
1bv	DGGAGHDRVLYSKDGGGLGNI	IIVDGT	HATEMGSYIVNRTVAKGDIYHEVVKRQDTAVGKRTETLEYR	YELRQVGYGYKSTDQLKSVEEII													
2bv																	
3bv																	
4bv	V			S					K								
5bv	V			S					K								
6bv																	
7bv				S					K								
1ov							T										
2ov							T										
3ov							T										
4ov							T										
5ov							T										
6ov							T										
1bx	D	F	F	T	S	A	T	K	R	E	K	I	Q	K	Q	N	V
2bx	D	F	F	T	S	A	T	K	R	E	K	I	Q	K	Q	N	V

Alelo	703	713	723	733	743	753	763	773	783					
1bv	GSQFNDNFNGSKFTDI	FHGGDGD	LLDGGAGDDRLFGGK	GADRLLGDDGNDLLDGGT	GDDV	IVRKG	GGND	TLYDSK	GNDK					
2bv						A		A						
3bv						K		S						
4bv														
5bv							A	A						
6bv						D	A	A						
7bv							A							
1ov		K		I		Q	A	A	K					
2ov		K		I		Q	A	A	K					
3ov		K		I		Q	A	A	K					
4ov		K		I		Q	A	A						
5ov		K		I		Q	A	A						
6ov		K		I		Q	A	A						
1bx	V	K	N	S	E	N	S	E	D	A	N	F	D	GT
2bx	V	K	N	S	E	N	S	E	D	A	N	F	D	GT

Alelo	793	803	813	823	833	843	853	863	873												
1bv	LAFADANLSELT	TIERTQE	GILIKL	NDNSGS	INVS	NWYI	ASKLV	NYHGHKTD	DNKIEHLIGKDGTYITSEQIDSLLENKQVGEKIT	SQQLQE											
2bv																					
3bv			V																		
4bv																					
5bv																					
6bv																					
7bv																					
1ov				I					G												
2ov				I					G												
3ov				I					G												
4ov				I	S				G												
5ov				I	S				G												
6ov				I	S				G												
1bx	I	DIM	K	IV	R	H	IPR	T	N	Q	QSN	H	Q	S	D	KI	QD	KD	TV	E	KK
2bx	I	DIM	K	IV	R	H	IPR	T	N	Q	QSN	H	Q	S	D	KI	QD	KD	TV	E	KK

Alelo	883
1bv	LANKNKSQEI
2bv	
3bv	
4bv	
5bv	
6bv	
7bv	
1ov	
2ov	D
3ov	D
4ov	V
5ov	
6ov	
1bx	DE
2bx	DE