

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

Ananda Paula Kowalski

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE CEPAS DE *Moraxella bovis*,
Moraxella bovoculi E *Moraxella ovis* COM POTENCIAL USO
VACINAL**

Santa Maria, RS
2016

Ananda Paula Kowalski

CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE CEPAS DE *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* E *Moraxella ovis* COM POTENCIAL USO VACINAL

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

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

Santa Maria, RS
2016

Ananda Paula Kowalski

CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE CEPAS DE *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* E *Moraxella ovis* COM POTENCIAL USO VACINAL

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

Aprovado em 13 de setembro de 2016:

Agueda Castagna de Vargas, Dr, UFSM
(Presidente/Orientadora)

Charles Fernando Capinos Scherer, PhD, HIPRA

Rafael Frandoloso, Dr, UPF

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realização desta importante etapa e pela qualidade de ensino.

À minha orientadora, Professora Agueda Castagna de Vargas pela confiança e carinho com que me orientou. Obrigada pelos desafios e me encorajar a vencê-los. Pelo exemplo profissional e zelo de seu papel na formação de seus alunos e orientados.

Ao Professor Rafael Frandoloso por generosamente ter me acolhido e proporcionado a realização deste trabalho. Muito obrigada pela atenção, paciência e entusiasmo com que me conduziu e dividiu seu conhecimento.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada – UPF por todo suporte durante a realização dos experimentos, em especial a Letícia T. Gressler e pós graduandos Julia P. Espindola e João A. Guizzo, que foram incansáveis e tornaram este trabalho possível. À vocês, minha dívida de gratidão.

À todos os colegas do LABAC desde o período da residência pela amizade e dedicação no auxílio em diversas etapas desse trabalho. À Claudia Balzan e Caiane Tasca, queridas Claudinha e Cacá e à Grazieli Maboni, meu agradecimento especial por toda ajuda nos experimentos e pelo suporte durante toda essa caminhada.

À minha querida família pelo apoio incondicional e por compreender minha ausência e falta de tempo.

Ao Welden Panziera, pelo incentivo, exemplo de determinação e alegria de viver.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram ou torceram para que eu chegasse até aqui hoje, minha gratidão.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE CEPAS DE *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* E *Moraxella ovis* COM POTENCIAL USO VACINAL

AUTOR: Ananda Paula Kowalski

ORIENTADOR: Agueda Castagna de Vargas

Ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é a principal doença ocular de bovinos. Altamente contagiosa, é responsável por significativas perdas econômicas para a pecuária no mundo inteiro. *Moraxella bovis* é, reconhecidamente, o agente primário da enfermidade em bovinos. Contudo, a ocorrência de outras espécies do gênero, incluindo *M. ovis* e *M. bovoculi*, recentemente descrita, têm sido comuns em surtos da doença e são suspeitas de serem causalmente associadas ao sucesso limitado de medidas preventivas, sobretudo do uso de bacterinas contendo apenas cepas de *M. bovis*. Esta dissertação descreve a caracterização antigênica de cepas de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* e de uma vacina comercial através da análise de reatividade cruzada por citometria de fluxo e da identificação de antígenos imunodominantes e conservados através de Western blotting. Antissoros contra cepas das três espécies foram obtidos a partir da imunização de coelhos Nova Zelândia e desafiados frente a um painel de cepas isoladas de bovinos e ovinos clinicamente acometidos pela doença entre 1983 e 2013 assim como cepas de referência de cada espécie. Cepas de campo de *M. bovoculi* (Mbv2 e Mbv3) reconheceram satisfatoriamente todas as cepas heterólogas. Contudo, as cepas Mbv3 (*M. bovoculi*), Mov2 (*M. ovis*) e Mov3 (*M. ovis*) destacaram-se pela maior intensidade de reconhecimento de cepas de suas respectivas espécies e sugerem que antígenos espécie-específicos desempenham importante papel na resposta imune do hospedeiro. A associação dos percentuais de reatividade aos perfis antigênicos evidenciados através da análise por *western blotting* indica que a resposta imune induzida por *Moraxella* spp. parece ser mediada por múltiplos antígenos de superfície dos quais, diversos são compartilhados entre as três espécies. Entre 32 diferentes proteínas detectadas, 22 (68,7%) foram reconhecidas por pelo menos um antissoro nos extratos protéicos de todas as cepas analisadas por *western blotting*. Nosso estudo sugere a seleção e combinação de cepas de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* circulantes para composição da unidade antigênica de vacinas como estratégia de controle de IBK e a utilização de citometria de fluxo como metodologia mais adequada para esta seleção.

Palavras-chave: *Pinkeye*, citometria de fluxo, reatividade cruzada, *Moraxella* sp., CIB.

ABSTRACT

ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* AND *Moraxella ovis* STRAINS WITH POTENTIAL USE IN VACCINES

AUTHOR: Ananda Paula Kowalski
ADVISOR: Agueda Castagna de Vargas

Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is the main ocular disease of cattle. Highly contagious, it is responsible for significant economic losses of livestock worldwide. *Moraxella bovis* is recognized as the primary agent of the disease in cattle. However, the occurrence of other similar species, including *M. ovis* and *M. bovoculi*, recently described, have been common in outbreaks of the disease and are suspected to be causally related to the limited success of preventive measures, especially the use of bacterins containing only strains of *M. bovis*. This dissertation describes the antigenic characterization of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* strains and a commercial vaccine by cross-reactivity using flow cytometry analysis and identification of immunodominant conserved antigens by Western blotting. Antisera against strains of the three species were obtained from immunization of New Zealand rabbits and challenged before a panel of strains isolated from cattle and sheep clinically affected by the disease between 1983 and 2013 as well as reference strains of each species. Field strains of *M. bovoculi* (Mbv2 and Mbv3) recognized satisfactorily all heterologous strains. However, Mbv3 (*M. bovoculi*), Mov2 (*M. ovis*) and Mov3 (*M. ovis*) strains stood out as the most intense recognition strains of their respective species and suggest that species-specific antigens play an important role in the host immune response. The association of reactivity percentage with the antigenic profiles, evidenced by Western blotting analysis, indicates that the immune response induced by *Moraxella* spp. appears to be mediated by multiple surface antigens of which many are shared between the three species. Among 32 different proteins identified, 22 (68.7%) were recognized by at least one antiserum in the protein extracts of all strains analyzed by Western blotting. Our study suggests (1) the selection and combination of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* strains to be used in the composition of antigenic unit vaccines as IBK control strategy and (2) the use of flow cytometry as the most appropriate methodology for this selection.

Keywords: Pinkeye, flow cytometry, cross-reactivity, *Moraxella* sp., IBK

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A- Proteínas potencialmente antigênicas identificadas em *Moraxella* spp. de importância para certoconjuntivite infecciosa bovina.....54

Apêndice B- Análise de proteínas imunodominantes e conservadas entre cepas de *Moraxella* spp., detectadas pela técnica de Western blotting. A) Membrana de nitrocelulose corada com corante cromogênico na qual os extratos proteicos totais de cepas de *Moraxella* spp. (1 ao 8) foram incubados com antissoro produzido contra a cepa Mbv3 (*M. bovoculi*) (1:100) e com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:1000 Sigma-Aldrich) como anticorpo secundário. MW: marcador de peso molecular (kDa) (Bio-Rad Laboratories); 1-2: Mbo1 e M.bo2 (*M. bovis*); 3-5: Mbv1, Mbv2 e Mbv3 (*M. bovoculi*) 6-8: Mov1, Mov2 e Mov3 (*M. ovis*), respectivamente. B) Histograma referente à coluna da amostra 5, onde os picos representam, em pixels, a intensidade de reconhecimento de cada proteína pelo antissoro.....55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Ceratoconjuntivite Infecciosa	11
2.2 Gênero <i>Moraxella</i> spp.	14
2.3 Controle e profilaxia da CI	18
3. MANUSCRITO - Antigenic characterization of <i>Moraxella bovis</i> , <i>Moraxella bovoculi</i> and <i>Moraxella ovis</i> strains with potential use in vaccines.....	21
Abstract.....	22
1. Introduction.....	22
2. Materials and methods	24
3. Results.....	28
4. Discussion.....	31
5. Conclusion	35
References.....	35
4. CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

Ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é a doença ocular mais comum e economicamente importante de bovinos em todo o mundo (HENSON; GRUMBLES, 1960; BAPTISTA, 1979; ALEXANDER, 2010). Embora raramente fatal, seu caráter altamente contagioso a destaca entre as principais enfermidades de importância para a exploração pecuária, impactando, sobretudo, no desenvolvimento de animais jovens, categoria que usualmente apresenta lesões mais graves (WILCOCK, 2007; CARMO et al., 2011).

Apesar do primeiro provável relato da doença ter ocorrido há mais de um século e *Moraxella bovis* ser reconhecida como principal agente etiológico desde 1952 (Barner apud PEARCE; MOORE, 2013), as medidas preventivas e terapêuticas disponíveis ainda têm limitado sucesso (BURNS; O'CONNOR, 2008; FUNK et al., 2009).

Em relação à imunização, a proteção vacinal, considerada de maneira geral, insatisfatória tem sido historicamente atribuída à diversidade antigênica entre fímbrias de *M. bovis* (MOORE; RUTTER, 1987; LEPPER et al., 1992; CONCEIÇÃO et al., 2003), sendo estas, a base antigênica da grande maioria das bacterinas disponíveis comercialmente. O conhecimento dessa diversidade há muito tem alertado para a necessidade de monitoramentos regulares de características antigênicas de isolados recuperados de surtos de CI em rebanhos (MOORE; RUTTER, 1987; CONCEIÇÃO et al., 2003).

Recentemente, o aprimoramento no diagnóstico laboratorial da CI, em grande parte, motivado pela necessidade de investigação de fatores relacionados à dificuldade de sucesso de um programa imunoprolático, tem considerado a associação das espécies *M. ovis* e *M. bovoculi* com a ocorrência da enfermidade. Sua participação na patogenia da doença é constantemente investigada (CERNY et al., 2006; ANGELOS et al., 2007c; ANGELOS, 2010a) e uma diversidade genotípica entre fatores de virulência identificados em cepas dessas espécies vem sugerindo a consideração das mesmas na concepção de estratégias de profilaxia mais adequadas (FARIAS et al., 2015; SOSA et al., 2015).

Assim, a incorporação de *M. ovis* assim como de *M. bovoculi* em vacinas autógenas tem sido sugerida na prática como uma ferramenta de controle da CI em bovinos (BARTOS, 2011; NEWPORT LABORATORIES, 2012), embora os resultados

experimentais de eficácia desta prática sejam divergentes (FUNK et al. 2009; ANGELOS, 2010a; ANGELOS et al., 2010). Contudo, sabe-se que a competição antigênica no hospedeiro é um fator limitante às valências a serem incluídas na formulação de vacinas polivalentes, visto que uma imunização adequada está condicionada à relevância dos componentes vacinais para as cepas e/ou espécies circulantes (McCONNEL; HOUSE, 2005). Em relação a *M. bovis* não há um consenso quanto aos antígenos imunodominantes necessários à indução de uma resposta imune satisfatória. Essa falta de informação é ainda maior em relação a *M. bovoculi* e *M. ovis*.

Ainda, em tempo, sabe-se que vacinas comerciais disponíveis para uso em bovinos são empregadas empiricamente em surtos da enfermidade em ovinos, espécie na qual a doença também é de grande importância, uma vez que não existem formulações específicas para esta espécie (CHAVES et al., 2008). Contudo, desconhece-se a eficiência desta prática assim como da relação antigênica entre cepas de campo de *M. bovis* e *M. ovis*.

Neste sentido, o conhecimento da diversidade antigênica entre cepas das três espécies de *Moraxella* de interesse veterinário, além de auxiliar na elucidação do papel destas espécies na etiologia da enfermidade, consiste numa etapa fundamental para se avançar em estratégias de prevenção mais eficazes contra a ceratoconjuntivite infecciosa. Assim, o presente estudo tem como objetivos: i) investigar a relação antigênica entre cepas de *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* isoladas de casos clínicos e ii) conhecer o repertório de antígenos imunodominantes e conservados entre elas, a fim de possibilitar a seleção de possíveis antígenos com potencial para o desenvolvimento de vacinas de amplo espectro contra as espécies de *Moraxella*. Este estudo resultou em um manuscrito a ser submetido para publicação, cuja introdução, material e métodos, resultados, discussão e conclusões obtidas serão apresentados a seguir.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ceratoconjuntivite Infecciosa

Ceratoconjuntivite infecciosa (CI), também conhecida como *pinkeye*, mal do olho, lágrima ou ainda, doença do olho branco, é a doença ocular mais comum e de maior importância em rebanhos bovinos e ovinos em todo o mundo (BAPTISTA, 1979; POSTMA et al., 2008). Altamente contagiosa e de distribuição mundial, a CI é considerada uma doença estacional, de portador e, geralmente, com prevalência elevada, ocorrendo principalmente na forma de surtos (PUNCH; SLATTER 1984; GIL-TURNES, 2007). Bovinos de corte ou leiteiros de todas as idades independente de sexo e raça podem ser acometidos, embora em estabelecimentos onde a doença é endêmica, as taxas de incidência sejam maiores nos animais jovens (GIL-TURNES, 2007). Alguns surtos podem atingir mais de 80% dos animais com uma duração de 3 a 4 semanas (BAPTISTA, 1979; POSTMA et al., 2008). Em ovinos, a enfermidade é mais comumente denominada de oftalmia contagiosa ovina (OC) e sua ocorrência está relacionada principalmente à alta densidade populacional e falhas no manejo sanitário (MARGATHO et al., 2006).

Animais clinicamente acometidos manifestam lacrimejamento intenso, fotofobia, blefaroespamo, conjuntivite e dor ocular, progredindo um a dois dias após, para edema e opacidade de córnea, a qual se inicia no centro, de forma centrífuga. Os animais não tratados ou que não apresentam cura espontânea neste estágio, frequentemente evoluem para ulceração de córnea, podendo desenvolver cegueira temporária e diferentes graus de cicatrização após a recuperação. A ruptura da córnea, em casos severos, resulta em cegueira completa e permanente (HENSON; GRUMBLES, 1960; BAPTISTA, 1979; ALEXANDER, 2010). Animais seriamente comprometidos podem apresentar dor intensa, perda de apetite e perda de peso. O período de incubação, geralmente varia de 8 a 18 dias (BAPTISTA, 1979).

A infecção raramente resulta em morte, porém é responsável por um impacto econômico bastante significativo nos rebanhos infectados em decorrência da perda de visão dos animais acometidos. As perdas estão relacionadas principalmente à redução de ganho de peso, diminuição na produção de leite além de custos com tratamento e profilaxia. Snowden e seu colaboradores (2005) estimaram uma perda de 8 a 18 kg no

ganho de peso de bovinos clinicamente afetados. Ainda, há de se considerar possíveis condenações no momento do abate devido a lesões oculares, a depreciação de valor de animais, descarte com reposição precoce de animais, atraso no melhoramento genético além da dificuldade de manejo dos animais com capacidade visual comprometida (SLATTER et al., 1982; MARGATHO et al., 2006; PEARCE; MOORE, 2013).

Historicamente, *Moraxella bovis* é considerado o principal agente etiológico da ceratoconjuntive infecciosa (HENSON; GRUMBLES, 1960; WEBER et al., 1982; CHANDLER et al., 1985). No entanto, outras espécies pertencentes ao gênero, como *Moraxella ovis* e, mais recentemente, *Moraxella bovoculi* também têm sido associados a casos da doença nos EUA, Brasil e Uruguai (ANGELOS et al. 2007a; LIBARDONI et al., 2012; SOSA; ZUNINO, 2012). Em ovinos, a etiologia primária da enfermidade está atribuída principalmente a *Mycoplasma conjunctivae* e *Chlamydia psittaci*, contudo, *Moraxella ovis* é oportunista e desempenha o papel secundário de exacerbar os sinais clínicos em infecções concomitantes com esses agentes (DAGNALL, 1994). Com uma menor frequência, *M. bovis* também pode ser isolada de lesões oculares nesta espécie (LIBARDONI et al., 2012).

Moraxella spp. são comensais das mucosas de mamíferos e susceptíveis à dessecação, não sobrevivendo bem fora do hospedeiro. A conjuntiva e a nasofaringe de bovinos e ovinos, inclusive sem quaisquer sinais ou histórico de infecção são reservatórios destes patógenos oportunistas (POSTMA et al., 2008). A CI é uma enfermidade multifatorial, sendo que, além de mecanismos de virulência próprios de cepas patogênicas e de condições de suscetibilidade como raça, idade e sistema imunológico do hospedeiro, o papel de fatores extrínsecos na estimulação da colonização e infecção, até mesmo por cepas de *Moraxella* spp. comensais é bem documentado (HUGHES et al., 1965; BAPTISTA et al., 1979).

A maioria dos surtos de CI ocorre desde o início da primavera até o final do outono (GIL-TURNES, 2007). Esta sazonalidade está relacionada ao aumento do fotoperíodo e, conseqüentemente, maior intensidade de exposição dos animais à radiação da luz ultravioleta, ressecamento da superfície corneal, irritação causada pela poeira e pela ação mecânica de pastagens (HENSON; GRUMBLES, 1960). A formação de pequenas lesões na conjuntiva ocular e o aumento da degeneração de células epiteliais da córnea após estas injúrias proporcionam condições favoráveis à colonização de *Moraxella* sp., dando início ao processo inflamatório local (VOGELWEID et al., 1986).

Além disso, nesse período há um aumento na população de vetores (*Musca autumnalis* e *M. domestica*) que favorecem a disseminação do patógeno de animais portadores para os suscetíveis, sendo esta a principal forma de transmissão. Sabe-se que *M. bovis* pode sobreviver por mais de três dias nas superfícies externas das moscas (GERHARD et al., 1982). *Moraxella* sp. também é transmitida por contato direto, descarga nasal ou ocular (KOPECKY et al., 1986) e ainda, através de fômites (POSTMA et al., 2008). Dessa forma, o manejo e o controle de vetores são essenciais no controle de surtos.

Bovinos de todas as raças podem ser acometidos, no entanto, zebuínos (*Bos indicus*) e suas cruzas parecem ser menos frequentemente afetados quando comparados às raças europeias (*Bos taurus*) (FRISCH, 1975; WEBBER; SELBY, 1981). Além da predisposição racial, a falta de pigmentação periocular parece estar associada com o aumento da incidência e severidade de leões em bovinos da raça Hereford. Acredita-se ainda que, uma menor eficiência antibacteriana da solução lacrimal de bovinos desta raça seja um fator colaborador na maior ocorrência de CI quando comparado a outras raças (SNOWDER et al., 2005). Pinheiro e seus colaboradores (1982), no entanto, a exemplo de outros autores, defendem a existência de progênies, entre animais da mesma raça, mais suscetíveis à doença que outras.

A ocorrência de surtos de CI, sobretudo em animais jovens, com frequência, está associada a infecções primárias tais como por adenovírus; herpesvirus tipo 1 (BoHV-1) (GEORGE et al., 1988) ou infestação por nematódeos (CARMO et al., 2011), capazes de comprometer ou debilitar o sistema imune. Algumas co-infecções ainda, parecem contribuir diretamente para a colonização de *Moraxella* sp. no epitélio corneal e início do processo inflamatório, ao induzirem uma injúria local inicial. Esta relação é, há muito, reconhecida na doença em ovinos, em que *M. ovis* é considerado um agente secundário, exacerbador dos sinais clínicos, em infecções concomitantes com *Mycoplasma* sp. ou *Chlamydia psittaci* (DAGNALL, 1994).

Rosenbusch (1983) e Rosenbusch & Ostle (1986) demonstraram experimentalmente que a prévia infecção por instilação ocular com *Mycoplasma bovoculi* favoreceu a colonização por *M. bovis* e *M. ovis* e o desenvolvimento de lesões em bovinos. Levisohn e seu colaboradores (2004), por sua vez, identificaram *M. bovoculi* associado a *Mycoplasma* sp. como a principal causa de um surto de CI em bovinos naturalmente infectados. Recentemente, Schnee et al. (2015) em um estudo de prevalência de infecção por *Mycoplasma bovoculi* e *Moraxella* spp. em bovinos, nos

diferentes estágios da doença, detectaram a presença de *Mycoplasma bovoculi* em 84% dos animais na fase aguda da enfermidade, sendo *M. ovis* a espécie mais prevalente entre *Moraxella* spp. em animais deste grupo.

2.2 Gênero *Moraxella* spp.

Espécie-tipo: *Moraxella lacunata*. Lwoff 1939 (Approved Lists 1980)

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).

Espécies do gênero *Moraxella* são bactérias Gram-negativas pertencentes à família *Moraxellaceae*, compreendida na classe das Proteobacterias (ROSSAU et al., 1991). Apresentam-se na forma de bastonetes curtos, cocobacilos ou cocos dispostos aos pares (ANGELOS, 2010b; PUGH; HUGHES, 1976) com acentuada tendência ao pleomorfismo após sucessivas passagens. Em meio ágar sangue formam colônias lisas ou rugosas, com 1 a 3 milímetros de diâmetro, circulares e esbranquiçadas de consistência friável (BROWN et al., 1998), com um estreito halo de β hemólise.

Estritamente aeróbicas e assacarolíticas, *Moraxella* spp. utilizam compostos orgânicos como fonte de energia (PETTERSSON et al., 1998) e o seu ótimo crescimento ocorre na temperatura entre 33 e 35°C. Caracterizam-se como oxidase positiva com reações de catalase variáveis e por não produzirem DNase, urease, indol e sulfito de hidrogênio. Embora descritas como células imóveis, uma motilidade lenta pode ser observada quando ligadas à superfície e a formação de cápsula pode ser demonstrada em isolados recentes (VAN HALDEREN; HENTON, 2004).

Vinte e duas espécies já foram descritas no gênero, das quais, algumas comensais das membranas mucosas de animais e seres humanos, e que ocasionalmente provocam infecções. Particularmente, de importância veterinária, a ceratoconjuntivite infecciosa (CI) é a principal doença causada por uma ou mais espécies do gênero *Moraxella* e que acomete ruminantes, especialmente de interesse econômico, bovinos e ovinos (MARGATHO et al., 2006; LOY; BRODERSEN, 2014).

Por décadas, *Moraxella bovis* tem sido reconhecida como agente primário da CI bovina (WEBER et al., 1982; BROWN et al., 1998) e para qual os mecanismos de

patogenicidade são melhores estabelecidos (HENSON; GRUMBLES, 1960; ANGELOS et al., 2003; ANGELOS, 2010b). Contudo, outras espécies do gênero *Moraxella*, têm sido comumente isoladas a partir de lesões oculares em bovinos, associadas ou não a presença de *M. bovis* (CERNY et al., 2006; ANGELOS et al., 2007a; LIBARDONI et al., 2012; SOSA; ZUNINO, 2012). *Moraxella ovis*, anteriormente denominada *Neisseria ovis* ou *Branhamella ovis*, comumente relacionada na etiologia da oftalmia contagiosa ovina (DAGNALL, 1994; CHAVES et al., 2008) e, mais recentemente, *Moraxella bovoculi* (ANGELOS et al., 2007a) têm sido investigadas quanto a sua participação na patologia da CI (CERNY et al., 2006; ANGELOS et al., 2007c).

Filogeneticamente relacionada à *M. bovis* e *M. ovis*, somente em 2007, *M. bovoculi* foi identificada como uma nova espécie associada à CI em bovinos. Cepas isoladas a partir de córneas ulceradas de bovinos criados na Califórnia foram distinguidas dos demais membros do gênero *Moraxella* pela caracterização bioquímica, sustentada pela análise dos genes constitutivos 16S, subunidade B da RNA polimerase, hidroxiaacil-CoA dehidrogenase, subunidade épsilon da ATP sintase F1, histidina quinase, phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptideo transferase e ferridoxina (ANGELOS; BALL, 2007; ANGELOS et al., 2007a). De maneira geral, cepas da *M. bovoculi* apresentam-se como cocos e diplococos, não têm atividade de fosfatase alcalina e em sua grande maioria, apresentam reação positiva ao teste de fenilalanina desaminase, embora esta pareça não ser uma característica consistente da espécie (ANGELOS; BALL, 2007).

Parece provável que *M. bovoculi* existe na população de bovinos há muito tempo, sendo que os cocos Gram-negativos previamente recuperados de secreções oculares de bovinos com CI ou saudáveis eram designados como "*M. ovis-like*", "*Branhamella ovis*", ou "*Branhamella ovis-like*" pela grande semelhança fenotípica com *M. ovis* (FAIRLIE, 1966; ELAD et al., 1988). Alguns autores sugerem que a grande maioria destes isolados, anteriormente identificados como *M. ovis*, deveriam ser reclassificados como *M. bovoculi* (O'CONNOR et al., 2012). Desde sua descrição, um número cada vez maior de estudos demonstram a presença de *M. bovoculi* associada a casos de CI bovina (ANGELOS et al., 2007a; LIBARDONI et al., 2012; SOSA; ZUNINO, 2012), sendo esta, considerada importante causa da enfermidade no Uruguai (SOSA; ZUNINO, 2013). Em alguns rebanhos, inclusive, esta tem sido a espécie de *Moraxella* mais prevalentemente isoladas a partir de lesões oculares (ANGELOS, 2010a; GOULD, 2013; LOY; BRODERSEN, 2014). De forma semelhante, *M. ovis* já

foi associada como uma importante causa de CI em alguns rebanhos bovinos (SCHNEE et al., 2015). No entanto, papel preciso destas duas espécies na patogenia da CI ainda não foi elucidado (O'CONNOR et al., 2012; SCHNEE et al., 2015).

Embora alguns autores acreditem na premissa de que estas duas espécies necessitem de lesões da córnea ou de outros fatores predisponentes para causar a enfermidade (DUBAY et al., 2000; O'CONNOR et al., 2012), evidências como a identificação de fatores de virulência semelhantes aos conhecidos para *M. bovis* (CERNY et al., 2006; ANGELOS et al., 2007a; SOSA et al., 2015) e a eficácia limitada de vacinas comerciais contendo apenas antígenos de *M. bovis* (MCCONNELL; HOUSE, 2005; BURNS; O'CONNOR, 2008) reforçam a hipótese de que tanto *M. bovoculi* como *M. ovis* podem desempenhar importante papel na patogenia da enfermidade, influenciando na frequência e gravidade dos surtos (ANGELOS, 2010a; SOSA; ZUNINO, 2013).

2.1.1 Fatores de virulência

A patogênese da CI é determinada por fatores de virulência, até o momento, mais claramente estabelecidos para *Moraxella bovis* (PUGH; HUGHES, 1976; BEARD; MOORE, 1994). A expressão de fímbrias (pili) tipo IV e a secreção de citotoxina com propriedades hemolítica e leucolítica constituem os determinantes primários de virulência de cepas patogênicas de *M. bovis*, considerados pré-requisitos para o estabelecimento da doença (PUGH; HUGHES, 1968, 1970; BEARD; MOORE, 1994).

Fímbrias tipo IV são organelas de superfície em forma de longas fibras poliméricas, ancoradas em feixes laterais na membrana exterior da bactéria (PELICIC, 2008) que, entre sua multifuncionalidade, desempenham papel crucial na adesão bacteriana a receptores específicos das células epiteliais da córnea e conjuntiva do hospedeiro (GIL-TURNES, 1983; LEHR et al., 1986). É consenso que o fenótipo dito fimbriado de *M. bovis* é a forma capaz de causar infecção persistente e doença ocular, enquanto a forma não fimbriada parece não ser patogênica aos bovinos (JAYAPPA; LEHR, 1986). Cepas virulentas quando submetidas à subcultivos frequentes deixam de expressar suas fímbrias, tornando-se avirulentas (MARRS et al., 1985). Alguns autores acreditam, no entanto, que outras adesinas possam estar envolvidas na adesão de cepas não fimbriadas (ANNUAR; WILCOX, 1985).

Além de essenciais para a colonização no hospedeiro, as fímbrias tipo IV são importantes imunógenos, visto sua exposição proeminente na superfície bacteriana (LEHR et al., 1985; MOORE; RUTTER, 1987). Contudo, a proteção sorológica induzida por estas parece restringir-se aos antígenos homólogos ou estritamente relacionados (MOORE; LEPPER, 1991; ANGELOS et al., 2007b). Tal fato é atribuído, sobretudo, à diversidade antigênica, há muito, identificada em testes sorológicos entre fímbrias de isolados *M. bovis* de diversas partes do mundo, base para qual, cepas *M. bovis* são, tradicionalmente, classificadas em sete sorogrupos sem reatividade cruzada entre si (A-G) (MOORE; LEPPER, 1991).

Ainda, um interessante mecanismo de variação de fase, pelo qual bactérias alteram a expressão de fímbrias de forma reversível, é reconhecido em *M. bovis*, auxiliando as bactérias a evadir do reconhecimento imunológico após a fase inicial de fixação (GILSDORF, 1998). Assim, dois tipos de fímbrias funcionalmente distintos são descritos e podem ser expressados durante o curso da doença pela mesma bactéria: fímbrias tipo Q, responsáveis pela aderência bacteriana inicial e fímbrias tipo I, as quais permitem a persistência e manutenção de uma infecção local estabelecida (FULKS et al., 1990; RUEHL et al., 1993). Este processo é possível devido ao fato de *M. bovis* possuir mais de um gene codificador de pilina, os quais codificam pilinas diferentes, situados em uma região inversora de 2,1 kb localizada em seu DNA genômico, sendo transcrito o gene que estiver adjacente ao promotor (MARRS et al., 1988). Recentemente, uma análise de genes com potencial para colonização em *M. bovoculi* revelou um único gene codificador da pilina, situação diferente do que ocorre em cepas de *M. bovis* (CALCUTT et al., 2014), no entanto, um indício que justifica novas investigações quanto a participação desta espécie no desenvolvimento da CI.

Cepas hemolíticas de *M. bovis* secretam MbxA (*M. bovis* toxin), uma citotoxina com propriedades corneotóxicas e leucotóxicas também estão correlacionadas positivamente com o desenvolvimento da doença clínica enquanto cepas não hemolíticas parecem ser não patogênicas (PUGH; HUGHES, 1968; 1970). Caracterizada como uma RTX (*repeats in the structural toxin*) por ser um tipo de toxina em que há inúmeras repetições de sequências ricas em glicina dentro da proteína, também é referida como “hemolisina” por produzir β -hemólise em placas de ágar sangue. MbxA é dependente de cálcio, e responsável pela formação de poros na membrana citoplasmática das células alvo (epiteliais, leucócitos, hemácias), provocando efluxo de potássio, desequilíbrio osmótico e lise (ANGELOS et al., 2001). Assim, sua

participação na patogenia da CI está em promover a formação de úlcera corneal por meio de lise de células da córnea e dos neutrófilos do hospedeiro (KAGONYERA et al., 1989).

De forma semelhante a *M. bovis*, em que MbxA é codificada pelo gene identificado como *mbxA* (ANGELOS et al., 2001), já se sabe que *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), reforçando indícios e sugerindo mecanismos pelos quais *M. bovoculi* e *M. ovis* podem estar envolvidos na patogênese da doença.

Outros fatores de virulência já identificados em *M. bovis* incluem fosfolipases, proteínas da membrana externa (*outer membrane proteins*- OMPs), lipopolissacarídeos (LPS), sistemas de aquisição de ferro (BROWN et al., 1998) e enzimas hidrolíticas e proteolíticas (FRANK; GERBER, 1981). Prieto et al. (1999) inclusive, ao analisarem a diversidade entre 57 isolados de *M. bovis* obtidos na Argentina no período de três anos, identificaram três perfis distintos de OMPs e de tipos de LPS, que combinados com a análise genotípica dos isolados, permitiram a subdivisão dos isolados em 15 subgrupos distintos.

Recentemente, a fim de identificar genes codificadores de antígenos possivelmente conservados entre uma variedade de cepas *M. bovis* e *M. bovoculi*, Sosa e colaboradores (2015) observaram a amplificação em proporções variáveis dos genes *omp79*, *plb*, *fur* e *tolC* entre cepas de *M. bovis*. *omp79* (OMP de 79kDa) e *fur* estão envolvidos na aquisição de ferro enquanto *plb* codifica uma fosfolipase. O gene *tolC* codifica uma OMP que desempenha um papel no movimento de moléculas através de membranas bacterianas e periplasma para o ambiente, incluindo a hemolisina MbxA (ROGERS et al., 1987) apresentando nesse estudo, sequências bastante conservadas entre os isolados. Sequências de DNA parciais de *tolC* e *fur* também são conhecidas para *M. bovoculi* (SOSA et al., 2015).

2.3 Controle e profilaxia da CI

Embora a CI seja, há muito, reconhecida como uma enfermidade altamente contagiosa, de distribuição mundial e causa de importantes perdas econômicas, os atuais esforços para conter a doença ainda não são suficientemente eficientes (BURNS;

O'CONNOR, 2008; FUNK et al., 2009; SOSA et al., 2015). Seu tratamento é por vezes, custoso e trabalhoso e, nem sempre efetivo (GIL-TURNES, 2007).

As duas principais estratégias de prevenção da doença em rebanhos são dirigidas para o controle de *Musca autumnalis*, principal vetor e para a imunização de animais suscetíveis através da vacinação de rebanhos (GIL-TURNES, 2007; BROWN et al., 1998). Atualmente, estão disponíveis no mercado diversas vacinas comerciais, sobretudo bacterinas contendo apenas cepas de *M. bovis* altamente fimbriadas ou constituídas por fímbrias purificadas. No entanto, a eficácia destas é limitada (BURNS; O'CONNOR, 2008; FUNK et al., 2009) e tem sido tradicionalmente atribuída a grande diversidade antigênica destes importantes imunógenos (MOORE; RUTTER, 1987; MOORE; LEPPER, 1991; CONCEIÇÃO et al., 2004). Estas vacinas parecem conferir proteção homóloga contra determinado sorogrupo ou estritamente relacionado e os resultados de proteção heteróloga são, na grande maioria, considerados insatisfatórios (PUGH; HUGHES, 1976; ANGELOS et al., 2007b; BURNS; O'CONNOR, 2008).

O desafio tem sido ainda maior ao se considerar a associação de *M. bovoculi* e *M. ovis* à ocorrência da enfermidade em rebanhos (ANGELOS et al., 2010; O'CONNOR, et al., 2012; SOSA et al., 2015). Embora a relação causal direta dessas espécies na patogenia da CI não esteja efetivamente comprovada, a frequência de isolamento destas em lesões oculares e a identificação de importantes fatores de virulência com diferenças de base genética em relação à espécie *M. bovis*, bem como a própria limitação na eficácia vacinal têm demonstrado a necessidade em se avaliar a inclusão de *M. bovoculi* e *M. ovis* na concepção de práticas mais eficazes de prevenção da enfermidade (SOSA; ZUNINO, 2013; SOSA et al., 2015; FARIAS et al., 2015). Da mesma forma, abordagens atuais de tratamento da doença têm considerado a investigação de perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas das três espécies de *Moraxella* de importância veterinária (ANGELOS, 2015; MABONI et al., 2015).

Ao longo dos anos, diversos métodos imunológicos têm sido utilizados para investigar a relação antigênica entre cepas de *M. bovis* (GIL TURNES; ARAUJO, 1982; LEPPER; HERMANS, 1986; MOOR; RUTTER, 1987), sendo a técnica de ELISA o principal deles (CONCEIÇÃO et al., 2003; PRIETO et al., 2003). ELISA também tem sido o método tradicionalmente utilizado para se determinar a imunogenicidade de potenciais antígenos vacinais. Contudo, a fidelidade dos resultados obtidos de testes em ELISA utilizando células inteiras para este fim tem sido questionada por alguns autores (COHEN et al., 2013). É possível que durante a etapa de incubação, as células

bacterianas sejam lisadas, possibilitando que anticorpos testados tenham acesso a antígenos intracelulares e, portanto, não representem necessariamente níveis de anticorpos potencialmente protetores.

Nesse sentido, a citometria de fluxo tem sido um recurso emergente na medicina veterinária e parece ser uma alternativa promissora em investigações de potenciais candidatos vacinais. O princípio da técnica baseia-se na análise de células em suspensão. Nesse caso, a quantificação de anticorpos testados ligados à epítomos é limitada a uma população de bactérias estruturalmente intactas, identificadas pelo tamanho relativo da célula (*Forward scatter- FSC*) e da complexidade (*Side Scatter- SSC*) (NAKAGE et al., 2005). Assim, ao contrário do ELISA, o nível de anticorpos pode representar um melhor reconhecimento de antígenos de superfície potencialmente protetores e, portanto, uma correlação mais confiável de proteção cruzada.

3. MANUSCRITO

Research paper

Antigenic characterization of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* strains with potential use in vaccines

Ananda Paula Kowalski^a, Agueda Castagna de Vargas^{a*}

(Artigo a ser submetido 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. Email address: aguada.vargas@gmail.com.

Antigenic characterization of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* strains with potential use in vaccines

Abstract

Moraxella bovis is historically known as the primary agent of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). However, the participation of *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in the pathogenesis of the disease has been considered and suggests the need of new approaches to vaccine coverage against the challenge of the three species. This study investigated the relationship between antigenic strains of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* and a commercial vaccine by cross-reactivity using flow cytometry analysis and identification of immunodominant conserved antigens using western blotting. Antisera produced from field isolates of *M. bovoculi* (Mbv2 and Mbv3) were able to recognize all strains satisfactorily. However, Mbv3 (*M. bovoculi*), Mov2 (*M. ovis*) and Mov3 (*M. ovis*) strains stood out as the most intense recognition strains of their respective species, suggesting that specie-specific antigens play an important role in host immune response. The immune response raised by *Moraxella* spp. appears to be mediated by multiple surface antigens of which many are shared between the three species. Our results suggest a selection and combination of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* strains to formulate an efficacious antigenic vaccine in order to prevent IBK.

Keywords: Cross-reactivity, *M. bovis*, *M. bovoculi*, *M. ovis*, IBK, flow cytometry

1. Introduction

Haemolytic and fimbriated strains of *Moraxella bovis* have been considered, for a long time, as the primary cause of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK)

(Chandler et al., 1985; Beard and Moore, 1994), which is considered the most common and economically important ocular disease in cattle worldwide (Henson and Grumbles, 1960; Baptista, 1979; Alexander, 2010). Vaccination is the main preventive strategy against the disease in cattle herds (Brown et al., 1998). Several *M. bovis* vaccines are commercially available and they are basically composed by whole cell or purified fimbriae of *M. bovis*. The unsatisfactory protective efficacy of these vaccines (McConnel and House, 2005; Burns and O'Connor, 2008) has been extensively recognized to be associated with antigenic diversity among the fimbriae antigen (Moore and Rutter, 1987; Moore and Lepper, 1991; Conceição et al., 2004).

Besides *M. bovis*, other species belonging to the genus, such as *Moraxella ovis* and more recently *Moraxella bovoculi*, have been isolated from IBK lesions, combined or not to the presence of *M. bovis* (Cerny et al., 2006; Angelos et al., 2007a; Libardoni et al., 2012; Sosa and Zunino, 2012). The precise role of these two species in the pathogenesis of the disease remains unclear (O'Connor et al., 2012; Schnee et al., 2015). *M. bovoculi* and *M. ovis* seem to express virulence genes similarly to *M. bovis* (Cerny et al., 2006; Angelos et al., 2007b) and based on that, several authors have assumed that *M. ovis* and *M. bovoculi* may be participating in the pathogenesis of IBK (Angelos, 2010; O'Connor et al., 2012; Dickey et al., 2016).

Therefore, the incorporation of *M. ovis* and *M. bovoculi* into autogenous vaccines has been recommended to increase the spectrum of protection against the disease (Bartos, 2011; Newport Laboratories, 2012). Despite the fact that the proper immunization is strongly related to the presence of circulating strains, the antigenic competition in the host is a limiting factor to the formulation of multivalent vaccines (McConnel and House, 2005).

Therefore, the identification of the best set of strains or functional antigens expressed in all species of *Moraxella* is a major challenge to design a conjugate vaccine with broad spectrum of protection. In this study, we have investigated the antigenic relationship between heterologous strains of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* using an approach that preserve the natural characteristics of the antigens, which is essential to provide similar results to the real mechanisms that happen in the host. Our results suggested that a vaccine containing *M. bovoculi* and *M. ovis* strains could provide a more complete protection against the disease.

2. Materials and methods

2.1 Strains and growth conditions

Eleven *Moraxella* sp. strains isolated from ocular secretion samples collected from cattle (n=7) and sheep (n=4) displaying clinical signs of IK were used for this study. Samples were obtained from southern Brazil (n=10) and Uruguay (n=1) between 1983 and 2013. *M. bovis* (ATCC10900), *M. bovoculi* (ATCCBAA1259) and *M. ovis* (ATCC19575) were included as reference strains (Table 1). Bacterial isolates were classified as *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* following the recommendation of Angelos and Ball (2007), Libardoni et al. (2012), Sosa and Zunino (2012), Maboni et al. (2015) and Farias et al. (2015) and were stored at -80 °C until use. The criteria used to select the strains included growth characteristic as rough colonies when cultured in blood agar with 5% sheep blood and self-bonding capacity in saline. Such characteristics are related to the presence of fimbriae, a major structural antigen of *Moraxella* (Brown et al., 1998).

2.2 Preparation of polyclonal antisera

Eight strains (Table 1, in bold) were used for production of polyclonal antisera in New Zealand white rabbits. *Moraxella* strains were grown overnight on 5% sheep blood agar at 37 °C. Isolated colonies were subcultured into brain heart infusion (BHI) broth (Himedia®) and incubated at 37 °C until achieved an optical density (OD) of 0.2 read at 600 nm. The bacterin used for immunization consisting of 1×10^6 whole cell/ml inactivated with formaldehyde 0.5% of formaldehyde, diluted in PBS pH 7.2 and 5% of aluminum hydroxide gel (v/v) was used as adjuvant. Also used was a commercial vaccine composed of *M. bovis* strains inactivated. The immunization protocol consisted of five inoculations, three performed subcutaneously (1 ml) at an interval of 14 days and two intravenously (1 ml) without adjuvant at an interval of seven days. Blood samples were collected from each of the eight animals on day zero and day seven after each inoculation. Following the immunization protocol the animals were anesthetized and total blood collection was performed. Serum were stored at -20 ° C until use. All experiments were conducted in accordance with the Ethical Committee for Animal Experimentation of UPF (protocol number 021/2016).

2.3 Flow cytometry antibody binding assay

The ability of the antisera to recognize the homologous strains as well as a panel of 13 heterologous strains of *Moraxella* spp. was assessed by flow cytometry. The strains were grown in 20 ml of BHI broth at 37 °C with stirring until reaching the late logarithmic phase (OD of 0.7) and then, washed twice with PBS ($4000 \times g$ for 10 minutes at 4 ° C). Then, 1×10^6 cells/ml of each strain were suspended in PBS and

incubated with 50 μ l of a 1:100 dilution of each inactivated serum (heat inactivated was performed at 56 °C for 30 min) for 1 h at 37 °C. Bacteria in PBS without serum was included in each assay as negative control. After two washes with 0.2 ml of PBS (5000 \times g for 3 min), the pellet was resuspended in 50 μ l of a 1:400 dilution of goat anti-rabbit IgG fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) and incubated for 1 h at 37°C. After two washes, a volume of 0.2 ml of PBS was added, and the cells were subjected to flow cytometric analysis on a FACSVerse Cytometer (BD Biosciences, USA). The bacterial population was first characterized by size (forward-angle scatter - FSC), complexity (side-angle scatter - SSC) and green fluorescence emitted by FITC. Data were analyzed using the BD FACSuite™ software (BD Biosciences, USA). Each strain was evaluated in duplicate. The percentage of recognition represent the number of bacteria recognized by the antibody into the total population and, the intensity of FITC fluorescence indicates the total number of antibodies associated to pathogen surface epitopes.

2.4 Western blotting (WB)

The same strains used in the production of rabbit polyclonal antisera were subjected to western blotting analysis with homologous and heterologous sera to detect immunodominant and conserved proteins. Total protein was extracted from overnight culture of each strain (BHI broth at 37 °C) by three steps of sonication in lysis buffer (50mM of NaH_2PO_4 , 300mM of NaCl, 30mM of $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$, 5% of glycerol, 0.5% of tryton, pH 8.0). The total protein extracts were subjected to SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gel for resolving and 5% stacking. After gel eletroforesis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 μ m) by semi-dry electrotransfer system (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Then the membranes were

blocked with tris-buffered saline(TBS: 50Mm of Tris-Cl, 150 mM of NaCl, pH 7,4) containing skim milk 3% for 30 minutes, washed twice in TBS-0.05% Tween and incubated for 1 h with the antisera diluted 1:100 in TBS with 0.5% of skim milk pH 7.2. After washing, the immunoblots were incubated with the secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluted 1:1000 for 1 h. The immunoblots were then washed as above and the bands were visualized by chromogenic substrate containing 4-cloro-1 naftol and H₂O₂. The reaction was interrupted by adding distilled water and the gel was photographed in the Amersham Imager 600 RGB (GE, Helthcare Life Sciences).

2.5 WB analysis

The total protein extract of each strain was analyzed based on the recognition of antigenic fractions by antibodies present in antisera tested by WB. Bands profiles obtained were analyzed with the software ImageQuant TL 1D version 8.1 (GE Healthcare Life Sciences). The image of all membranes scanned were transformed to grayscale mode. The molecular mass of the proteins was estimated in comparasion with standard molecular marker, considering the relative electrophoretic migration distance. The intensity of the areas was calculated by analysis tool gel/blot. Graphs with intensity peaks indicative of the detected bands were generated. The background of the reaction was eliminated by subtracting the area under the intensity peaks.

2.6 Statistical analysis

The intensity of bacterial detection and the percentage of recognition by specific antisera were analyzed using one way ANOVA/Tukey's test, with significance level of 5%.

3. Results

3.1 Flow cytometry analysis

3.1.1 Cross-reactivity

The cross reactivity between homologous and heterologous strains of *Moraxella* spp. was recorded from the average percentage (\pm SEM) of antisera IgG binding to bacterial surface antigens of all strains included in this study using flow cytometry data. Table 2 shows the recognition percentage of each antiserum against the three species of *Moraxella*.

The antisera against Mbv2, Mbv3, Mov3, Mbv1, Mbo1, Mov1, Mov2 and Mbo2 showed an average of recognition of 85.2%, 84.8%, 81.6%, 81.5%, 80.5%, 80.4%, 74.3% and 71.4% for all strains evaluated, respectively. The antiserum obtained from the commercial vaccine showed an average recognition of 76.9% from the same panel.

Regarding the intraspecies cross-reactivity we found recognition of 88.1%, 86.4% and 78.2% between *M. bovoculi*, *M. bovis* and *M. ovis*, respectively. Evaluating the interspecies cross-reactivity we found 84.4% of recognition of *M. ovis* antisera against *M. bovis*, and 82.3% and 80.7% of *M. bovoculi* antisera against *M. bovis* and *M. ovis*, respectively. *M. bovis* antisera showed recognition averages of 76.3% and 67.1% against *M. bovoculi* and *M. ovis*, respectively.

Considering the minimum percentage of 70% for satisfactory reactivity, the antisera against Mbv2 and Mbv3 stood out once they presented satisfactory cross-reactivity against all tested strains. With the exception of Mbv2 strain, all other *M. bovoculi* were successfully recognized by all antisera, highlighting the ability of these strains to induce an extended antibody response against this specie (Table 2).

The cross-reactivity of antibodies produced by immunization with a commercial vaccine against *M. bovis*, *M. bovoculi*, and *M. ovis* was 83.7%, 77.8% and 70.6%,

respectively. Only two of the five strains of *M. ovis* (Mov1 and Mov2) were successfully recognized (cross-reactivity > 70%) by this antiserum, which may mean an undesirable induced protection against challenge with *M. ovis* (Table 2).

3.1.2 Intensity of antibody recognition

Table 3 shows the fluorescence intensity according to the number of antibodies associated to the cell of surface epitopes in each immunostaining. In general, the mean fluorescence intensity between strains of the same species was 5,873, 5,371 and 4,420 for *M. ovis*, *M. bovis* and *M. bovoculi*, respectively. In an interspecies analysis, *M. bovoculi* antisera recognized similarly *M. bovis* and *M. ovis* strains (5,304 and 4,120, respectively). *M. bovis* antisera recognized *M. bovoculi* strains at a much higher intensity (average 5,912) compared to *M. ovis* (2,645). *M. ovis* antisera appeared to recognize *M. bovis* strains (average of 5,217) more efficiently compared to *M. bovoculi* recognition (average 3,234).

In general, the antiserum against Mov2 and Mov3 (both *M. ovis*) presented mean fluorescence higher than other antisera when were evaluated against *M. bovis* strains. Similarly, Mbo3 (*M. bovoculi*) and Mov2 (*M. ovis*) antisera showed higher fluorescence intensity against *M. bovoculi* and *M. ovis* strains. The fluorescence intensity of Mbo2 (*M. bovis*) antiserum against *M. bovoculi* and *M. ovis* was noticeably lower when compared to others.

3.2 Western blotting

The western blotting analysis identified a vast repertoire of antigenic polypeptides in all extracts analyzed. The spectrum profile range of the immunoreactive

bands varied from 10-312 kDa. The bands recognized on total protein extracts from each strain by homologous and heterologous antisera are shown in Table 4. A total of 32 different immunoreactive proteins were detected, of which 22 (68.7%) were recognized in all extracts analyzed by one or more antisera tested (10, 15, 16, 21, 27, 28, 30, 33, 35, 39, 48, 52, 54, 61, 62, 71, 75, 82, 85, 94, 102 and 111 kDa). Of these, five proteins (30, 35, 39, 54 and 62 kDa) were highly conserved, and were recognized by at least 6 of the 8 antisera in all extracts (75% or more recognition).

The values of recognition intensity bands ranged from < 1 to 32×10^3 pixels and are presented in range 1 to 7 (Table 4). Of the five proteins highly conserved among strains analyzed in this study, the 30 kDa protein stood out for being strongly recognized (scale 5-7) for one or more antisera in each protein extract. Similarly, a 35kDa band was highly reactive among the three species of *Moraxella*. Some other bands were strongly immunogenic but were recognized less often.

Interestingly, some antigens appeared to be important for one or another species of *Moraxella* in particular. The polypeptide with molecular weight of 48 kDa was strongly detected by antisera from three species of *Moraxella* in extracts of *M. ovis* strains. Similarly, the species *M. bovis* and *M. bovoculi* respectively show bands of 15 kDa and 52kDa highly conserved and immunodominant between their strains. These proteins were also identified in other extracts, but sporadically and with less intensity. A 28 kDa antigen shared by all strains was shown to be conserved among species *M. bovoculi* and *M. ovis*, in which the reactivity was higher in antisera obtained from strains of these species. In the other hand only *M. ovis* strains showed encode an immunoreactive protein of approximately 297 kDa, which was unrecognized by *M. bovis* antisera.

4. Discussion

Immunogenicity and ability to induce a protective immune response along with high interspecies expression and conservation are essential features for vaccinal antigens (Murphy, 2005). In this context, we investigated potential candidates to compose a vaccine capable to provide a satisfactory protection against *M. bovis*, *M. ovis* and *M. bovoculi* antigens. The potential heterologous protection of these three *Moraxella* species was investigated by flow cytometry immunoassay based on the detection of antibodies specifically bound to surface epitopes of intact cells. This analysis demonstrated the cross-reactivity profile by percentage of recognition between heterologous strains and the intensity of fluorescence emitted on each immunostaining, which indicates the number of antibodies involved in the recognition of the repertoire of native epitopes expressed by each strain. Additionally, the western blotting analysis allowed us to detect potential antigens mediating these responses.

Our results showed a reduced cross-protection potential induced by *M. bovis* against the other two species. In contrast, *M. bovoculi* was more efficient in recognizing cross-and heterologous strains among the three species. We believe that antibody response may be primarily mediated by antigens shared between the three species.

Our results of cross-reactivity by interspecies are in agreement with the level of antibody recognition (measured by fluorescence intensity) observed for the *Moraxella* species evaluated. The low cross-reactivity (67.1%) of *M. bovis* antisera against *M. ovis* seems to be related to the reduced intensity of fluorescence observed between these species (2,097 mean). Although the average percentage of reactivity among *M. ovis* strains (78.2%) was lower than the other species, the intensity of fluorescence (5,873) observed demonstrates the potential recognition of surface antigens of this specie.

The commercial vaccine, composed by *M. bovis* strains, showed a similar cross-reactivity profile to the *M. bovis* strains used in the present study, which showed lower cross-reactivity against *M. bovoculi* and *M. ovis* strains when compared to intraspecific recognition. The recognition profile observed among *M. bovis* may also be sustained by data from intensity of fluorescence, which was considerably higher in *M. bovis* (10,604 mean) when compared to *M. bovoculi* (1,953 mean) or *M. ovis* (3,122 mean). Similarly, the intensity of fluorescence-mediated response of Mbo2 (*M. bovis*) antiserum against *M. bovoculi* and *M. ovis* strains were notably low, demonstrating its limited antigenic potential against these species, although percentages of recognition were apparently satisfactory against Mbv1, Mbv4 and Mbv5, all *M. bovoculi* strains.

The use of western blotting as a complementary technique to investigate the cross reactivity between isolates has revealed a variety of immunoreactive proteins, suggesting that many antigens are responsible for the immunogenicity of *Moraxella* spp. The detection of 22 conserved bands among all extracts analyzed demonstrates the diversity of conserved antigens among strains of the three species of *Moraxella* associated to IBK.

The higher frequency of recognition of conserved proteins (approximately 30, 35, 39, 54 and 62 kDa) by all antisera analyzed suggests that these might represent important components involved in the induction of immune response against *Moraxella* species. Preserved polypeptides of 30, 34.7 and 39 kDa were identified in analysis of the outer membrane proteins (OMPs) diversity of 57 isolates of *M. bovis* recovered from IBK outbreaks of extensive areas of Argentina (Prieto et al., 1999). The same study identified bands of 15 to 28 kDa proteins common to several isolates, which was proved to be shared by all strains included in our analysis. Interestingly, a band of 71 kDa, present in all extracts, it was recognized only by

antisera produced against Mbv2 and Mbv3 strains. The antisera from both strains showed high recognition against entire panel of strains. Ostle and Rosenbusch (1986) identified a protein with the same molecular weight between OMPs in isolates of *M. bovis*. OMPs play an important role in the pathogenesis of IBK by increasing bacteria adaptability to different environmental conditions. They are exposed on the surface of the bacterial cell, hence they are suitable antigens in the pathogen recognition by the host immune system (Ostle and Rosenbusch, 1986). For those reasons, OMPs have been recognized as promising targets for the design of more effective vaccines to outcome IBK (McConnell and House, 2005).

We found different proteins being recognized in a different intensity among *Moraxella* species. *M. bovis* extract had a 15kDa protein highly recognized by all antisera, the same was observed for *M. bovoculi* (52 kDa protein) and *M. ovis* (48 kDa protein). These findings suggest the highlighted importance of the antigenicity of those proteins in the respective *Moraxella* species. Similarly, two bands with approximate 117 and 139 kDa appeared to be exclusively present in *M. ovis* and *M. bovoculi* strains, respectively, and, although the former demonstrated antigenic relationship with other species, the second one is not recognized by *M. bovis* antisera.

Although bands of approximately 15, 16 and 21kDa were detected for all strains analyzed, they were not recognized by all antisera and showed high range of intensity of recognition. Considering the size, it is possible that those bands represent pilins (piliA), structural type IV pilus subunits (Tfp), which have 15-20 kDa (Jayappa and Lehr, 1986). Tfp are highly immunogenic (Moore and Lepper, 1991; Angelos et al., 2007c) and play an essential role in the pathogenesis of IBK, since it is responsible for bacterial adherence and colonization in eukaryotic cells (Jayappa and Lehr, 1986). Notably, the antigenic diversity of these structures in *M. bovis* isolates has been documented as the

primary reason for the limited reactivity between heterologous strains (Conceição et al., 2003; Angelos et al., 2007c).

The selection of immunodominant and highly conserved antigen is a rational approach to search for satisfactory protection levels and broad spectrum vaccines (Ren and Pichichero, 2015). Some proteins, such as those with an approximate molecular weight of 30 and 35 kDa, recognized by conserved and highly homologous and heterologous sera in the western blotting analysis, may represent interesting antigens for cross-reactivity between the three species of *Moraxella*. The same is observed for the 48 kDa protein of *M. ovis* species. However, to associate the protein recognition profiles of antisera against different extracts with the fluorescence intensity values obtained by flow cytometry is possible to observe that the latter is influenced by the number of recognized proteins, independent recognition intensity observed in Western blotting. This information demonstrates that the antibody recognition of *Moraxella* require multiple proteins on their cell surface. The high intensity of recognition observed for 30, 35 and 48 kDa bands suggests that these proteins are higher expressed by some strains.

The recognition profiles observed in this study suggest the association of Mbv3, Mov2 and Mov3 strains as the best option to cover heterogeneously the panel of strains evaluated. Moreover, we highlighted the importance of fluorescence intensity as a parameter to access the magnitude of antigen recognition.

Once the analysis by western blotting allowed us to evaluate only linear epitopes we additionally highlighted the possibility of conformational epitopes being associated to the antibody recognition by flow cytometry. The use of live bacteria for the flow cytometry analysis allowed us to better explore the antigenic characteristics of the surface antigens. Herein, the fluorescence intensity was used to demonstrate the number of antibody molecules that were recognizing the repertoire of native epitopes from

Moraxella species, which represents a more reliable approach to achieve the real events during the pathogenesis of IBK. Therefore, this is the first study of cross reactivity between strains of the three *Moraxella* species involved in the etiology of IBK using flow cytometry analysis. In addition, to our knowledge, it is the first serological investigation of antigenic relationship between *M. bovis*, *M. ovis* and *M. bovoculi*.

5. Conclusion

The immune response triggered by *Moraxella* spp. appears to be mediated by multiple surface antigens that seem to be shared between the three species. However, a high reactivity within the same specie suggests that specie-specific antigens play an important role in the host immune response. Cross-reactivity analyses using flow cytometry technic has revealed to be a useful tool in the evaluation of antigenic strains of *Moraxella* spp. In summary, we highlight the need of selection of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* strains for vaccine composition aiming the control of these microorganisms implicated in occurrence of IBK.

Conflicts of interest: none

References

- Alexander, D., 2010. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. *Vet. Clin. N. Am-Food A.* 26, 487-503.
- Angelos, J.A., 2010. *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keractojunctivitis: Cause or coincidence? *Vet. Clin. N. Am-Food A.* 26, 73-78.

Angelos, J.A., Ball, L.M., 2007. 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., Spinks, P.Q., Ball, L.M., George, L.W., 2007a. *Moraxella bovoculi* sp. nov. isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. Int. J. Syst. Evolut. 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., 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.

Baptista, P.J.H.P., 1979. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. Brit. Vet. J. 135, 225-242.

Bartos, A., 2011. Culturing pink eye lesions: *Moraxella bovis* vs. *Moraxella ovis*. Dairy herd management. Disponível em: <<http://www.cattlenetwork.com/bovine-vet/culturing-pinkeye-lesions-moraxella-bovis-vs-moraxella-ovis-114035269.html>>.

Acess. in 15 may. 2015.

Beard, M.K., Moore, L.J., 1994. Reproduction of bovine keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. Vet. Microbiol. 42, 15–33.

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.

Cerny, H.E., Rogers, D.G., Gray, J.T., Smith, D.R., Hinkley, S., 2006. Effects of *Moraxella (Branhamella) ovis* culture filtrates on bovine erythrocytes, peripheral mononuclear cells, and corneal epithelial cells. *J. Clin. Microbiol.* 44, 772-776.

Chandler, R.L., Smith, K., Turfrey, B.A., 1985. Exposure of bovine cornea to different strains of *Moraxella bovis* and to other bacterial species *in vitro*. *J. Comp. Pathol.* 95, 415–423.

Conceição, F.R., Gil-Turnes, C., 2003. *Moraxella bovis*: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. *Cienc. Rural*. 33, 778-787.

Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., Paolichi, F., Leturia, A.C.F., 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.

Dickey, A.M., Loy, J.D., Bono, J.L., Smith, T.P.L., Apley, M.D., Lubbers, B.V., DeDonder, K.D., Capik, S.F., Larson, R.L., White, B.J., Blom, J., Chitko-McKown, C.G., Clawson, M.L., 2016. Large genomic differences between *Moraxella bovoculi* isolates acquired from the eyes of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis versus the deep nasopharynx of asymptomatic cattle. *Vet. Res.* 47, 31.

Farias, L.A, Maboni G., Matter, L.B., Scherer C.F.C., Libardoni, F., Vargas, A.C., 2015. Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3 region of *rtxA* gene from geographically diverse strains of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet. Microbiol.* 178, 383-287.

- Henson, J.B., Grumbles, L.C., 1960. Infectious bovine keratoconjunctivitis. I. Etiology. *Am. J. Vet. Res.* 21, 761-766.
- 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.
- 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).
- Maboni, G., Gressler, L.T., Espindola, J.P., Schwab, M., Tasca, C., Potter, L., Vargas, A.C., 2015. Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. *Braz. J. Microbiol.* 46,545-549.
- 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.
- Murphy, T.F., 2005. Vaccine development for non-typeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: progress and challenges. *Expert. Rev. Vaccines.* 4, 843-53.
- Newport Laboratories. 2012. *Moraxella bovoculi* update on the "new pinkeye": reports of year-round incidence. Disponível em: <<http://www.newportlabs.com/sites/default/files/NL4380%20Pinkeye%20Tech%20Bulletin.pdf>>. Aces. in 17 may. 2015.
- O'Connor, A.M., Shen, H.G., Wang, C., Opriessnig, T., 2012. Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef

calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). *Vet. Microbiol.* 155, 374-380.

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.

Ren, D., Pichichero, M.E., 2015. Vaccine targets against *Moraxella catarrhalis*. *Expert Opin. Ther. Targets.* 20, 19-33.

Rosenbusch, R.F.; Ostle, A.G., 1986. *Mycoplasma bovoculi* infection increases ocular colonization by *Moraxella ovis* in calves. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1214–1216.

Schnee, C., Heller, M., Schubert, E., Sachse, K., 2015. Point prevalence of infection with *Mycoplasma bovoculi* and *Moraxella* spp. in cattle at different stages of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. J.* 203, 92–96.

Sosa, V., Zunino, P., 2012. Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated with infectious bovine keratoconjunctivitis in Uruguay. *Vet. J.* 193, 595-597.

Table 1. *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* strains from IK outbreaks and reference strains used in this study.

Strain	Identification	Classification	Origin	Year	Host	Characterization
Mbo1	ATCC 10900	<i>M. bovis</i>	US	(-)	Cattle	-
Mbo2	TORRES	<i>M. bovis</i>	Br	2000	Cattle	Farias et al., 2015; Maboni et al., 2015
Mbo3	SB24/90	<i>M. bovis</i>	Br	1990	Cattle	Libardoni et al., 2012; Maboni et al., 2015
Mbo4	SB151/01	<i>M. bovis</i>	Br	2001	Cattle	Libardoni et al., 2012
Mbv1	ATCC BAA1259	<i>M. bovoculi</i>	US	2007	Cattle	Angelos et al., 2007
Mbv2	GF9	<i>M. bovoculi</i>	Br	<1990	Cattle	Farias et al., 2015
Mbv3	R2	<i>M. bovoculi</i>	Br	<1990	Cattle	Farias et al., 2015
Mbv4	2419	<i>M. bovoculi</i>	Uy	1983	Cattle	Sosa and Zunino, 2012
Mbv5	SB150/02	<i>M. bovoculi</i>	Br	2002	Cattle	Libardoni et al., 2012
Mov1	ATCC 19575	<i>M. ovis</i>	US	(-)	Sheep	-
Mov2	SB567/05	<i>M. ovis</i>	Br	2005	Sheep	Libardoni et al., 2012; Maboni et al., 2015
Mov3	SB06/08	<i>M. ovis</i>	Br	2008	Sheep	Libardoni et al., 2012; Maboni et al., 2015
Mov4	SB07/08	<i>M. ovis</i>	Br	2008	Sheep	Libardoni et al., 2012; Maboni et al., 2015
Mov5	SB07/13	<i>M. ovis</i>	Br	2013	Sheep	Farias et al., 2012; Maboni et al., 2015

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

Bold indicates the strains used for production of polyclonal antisera in New Zealand white rabbits.

Table 2. Recognition percentage of the bacterial population of *M. bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis* strains assessed by flow cytometry.

Strain	Specific antisera								
	Mbo1	Mbo2	Mbv1	Mbv2	Mbv3	Mov1	Mov2	Mov3	Commercial vaccine
Mbo1	81.00±0.2 ^{ab}	95.50±1.5 ^a	82.80±0.4 ^{ab}	70.89±8.7 ^b	96.63±1.7 ^a	95.32±2.0 ^a	93.62±2.0 ^{ab}	93.39±3.0 ^{ab}	90.21±8.1 ^{ab}
Mbo2	96.86±1.2 ^{ab}	93.93±1.0 ^{abc}	82.37±1.4 ^{cb}	98.34±0.2 ^a	82.87±1.8 ^{bc}	80.42±2.9 ^{bc}	65.88±4.6 ^d	87.24±3.4 ^{abc}	83.50±2.2 ^{bc}
Mbo3	91.91±0.6 ^{ab}	86.27±2.5 ^{abc}	89.17±2.3 ^{ab}	92.31±1.1 ^{ab}	92.80±0.2 ^{ab}	90.44±0.6 ^{ab}	81.41±6.9 ^{bc}	96.71±0.1 ^a	74.06±1.5 ^c
Mbo4	78.43±3.5 ^{ab}	67.36±10.5 ^{abc}	36.07±7.6 ^c	86.16±1.7 ^a	77.29±4.1 ^{ab}	87.53±7.5 ^a	53.87±6.3 ^b	87.42±0.0 ^a	87.18±3.3 ^a
Mbv1	89.23±2.2 ^a	82.39±5.5 ^a	82.29±1.7 ^a	90.80±0.1 ^a	83.98±2.6 ^a	76.37±5.1 ^a	52.32±1.9 ^b	75.15±4.9 ^a	78.67±2.2 ^a
Mbv2	53.65±11.2 ^{abc}	22.70±0.5 ^c	64.40±4.8 ^b	82.73±1.5 ^a	80.97±2.1 ^a	65.08±8.0 ^b	47.31±9.3 ^{bc}	44.53±2.3 ^{bc}	54.64±3.2 ^{abc}
Mbv3	91.40±4.6 ^a	71.41±5.5 ^b	97.83±0.1 ^a	95.53±0.7 ^a	92.88±2.1 ^a	85.28±3.1 ^{ab}	85.51±4.7 ^{ab}	83.60±0.3 ^{ab}	86.84±0.1 ^{ab}
Mbv4	81.66±0.5 ^b	89.97±2.2 ^{ab}	95.92±0.8 ^a	82.70±3.7 ^{ab}	93.22±0.9 ^a	75.86±1.4 ^b	76.91±1.5 ^b	83.90±1.6 ^{ab}	88.09±2.5 ^{ab}
Mbv5	86.39±1.8	94.78±0.1	92.95±1.4	91.89±0.7	94.11±0.6	90.99±5.8	86.64±4.0	91.39±7.8	80.75±3.4
Mov1	87.25±2.0	77.72±3.0	88.33±0.1	80.11±4.6	82.57±0.7	86.35±1.0	77.77±2.4	88.31±1.4	82.35±3.7
Mov2	72.92±0.2 ^{ab}	68.84±1.7 ^{ab}	79.26±1.3 ^a	86.80±0.2 ^a	74.39±4.5 ^{ab}	60.15±0.6 ^b	76.48±2.1 ^{ab}	69.32±0.7 ^{ab}	75.90±8.5 ^{ab}
Mov3	77.87±3.6 ^{abc}	74.71±3.1 ^{bc}	94.17±2.3 ^a	81.34±2.3 ^{abc}	78.70±5.0 ^{abc}	87.01±4.4 ^{ab}	85.20±0.1 ^{ab}	76.80±3.4 ^{abc}	64.50±3.6 ^c
Mov4	71.47±5.1 ^b	48.48±0.6 ^c	84.61±1.5 ^{ab}	73.94±0.6 ^b	81.04±2.3 ^{ab}	81.83±3.1 ^{ab}	86.53±1.5 ^a	88.89±2.8 ^a	62.48±1.2 ^c
Mov5	67.08±12.7 ^a	25.22±8.6 ^b	70.28±5.4 ^a	79.07±5.2 ^a	75.54±5.4 ^a	62.43±5.1 ^{ab}	70.69±1.2 ^a	75.61±2.2 ^a	67.88±9.8 ^a

Highlighted the reactivity > 70% (satisfactory). $p=0.05$.

Table 3. Number of bacterial surface-associated antibodies measured by the intensity of fluorescence emitted by bacteria marked with FITC assessed by flow cytometry. The decreasing colors degrade highlights the antibodies that mediated the highest recognition epitopes during immunostaining.

Strains	Specific antisera and intensity of bacterial detection								Commercial vaccine
	Mbo1	Mbo2	Mbv1	Mbv2	Mbv3	Mov1	Mov2	Mov3	
Mbo1	4795±1171 ^{ab}	3975±1253 ^{ab}	1123±200 ^b	1417±305 ^b	1574±206 ^b	1279±2 ^b	748±10 ^b	8000±1321 ^a	3295±1984 ^{ab}
Mbo2	5932±882 ^a	4411±387 ^{ab}	2339±314 ^{bc}	2800±210 ^{bc}	2407±215 ^{bc}	1066±62 ^c	1282±216 ^c	2006±184 ^c	2821±343 ^{bc}
Mbo3	6228±542 ^{bc}	1987±473 ^c	19969±245 ^a	5291±1619 ^{bc}	3928±1690 ^c	3993±1581 ^c	14828±2018 ^a	6381±2225 ^{bc}	12754±1462 ^{ab}
Mbo4	1453±211	6578±1389	1564±186	19295±2745	1943±174	11404±3469	1377±16	10247±1075	23548±13241
Mbv1	3783±376 ^{bc}	570±23 ^d	7740±1474 ^a	2464±503 ^{bcd}	4593±190 ^{ab}	1396±479 ^{bcd}	1601±29 ^{bcd}	1932±51 ^{bcd}	741±316 ^{cd}
Mbv2	1041±36 ^{cd}	580±72 ^d	1499±61 ^{bc}	2322±195 ^{ab}	2716±185 ^a	1210±174 ^{cd}	989±31 ^{cd}	1137±128 ^{cd}	1499±270 ^{bc}
Mbv3	3867±1881	317±21	2131±413	1865±143	3078±959	1922±595	1575±556	2213±736	2055±437
Mbv4	2137±169 ^{ab}	1219±9 ^b	2456±194 ^{ab}	4926±1069 ^a	2336±347 ^{ab}	2503±1456 ^{ab}	2164±432 ^{ab}	4511±343 ^{ab}	1603±95 ^{ab}
Mbv5	16589±1963 ^{ab}	2456±28 ^c	17088±1928 ^a	12959±1116 ^{abc}	12400±1491 ^{abc}	9561±1026 ^{cd}	10067±40 ^{bcd}	5726±1209 ^{de}	3870±366 ^{de}
Mov1	3442±203 ^{bc}	688±37 ^c	4673±503 ^{ab}	3630±755 ^{abc}	3219±734 ^{bc}	6570±2 ^a	6632±1153 ^a	3945±333 ^{ab}	2362±91 ^{bc}
Mov2	3724±57 ^d	721±3 ^e	3586±72 ^d	5237±400 ^{cd}	6515±181 ^{bc}	8420±1144 ^{ab}	9802±16 ^a	4301±194 ^{cd}	4816±112 ^{cd}
Mov3	4137±659 ^{ab}	617±76 ^c	4024±92 ^{ab}	3385±404 ^{bc}	4095±179 ^{ab}	5158±707 ^{ab}	5962±1014 ^{ab}	6976±805 ^a	3612±57 ^{bc}
Mov4	1653±238 ^{bc}	509±0 ^c	2696±411 ^b	1752±358 ^b	4219±229 ^a	4663±65 ^a	4398±106 ^a	2609±133 ^b	1590±175 ^{bc}
Mov5	4769±1566 ^a	713±45 ^b	3727±187 ^{ab}	5698±132 ^a	5354±723 ^a	6779±184 ^a	6636±601 ^a	5242±257 ^a	3231±473 ^{ab}

$p=0.05$.

Table 4. Frequency and intensity of immunoreactive proteins of total protein extracts of *M. bovis* strains, *M. bovoculi* and *M. ovis* against the homologous and heterologous antisera analyzed by Western blotting.

Strain	Antisera	Approximate molecular weight of reactive bands on the Western blotting (kDa)																																
		312	297	193	139	117	111	102	94	85	82	75	71	67	62	61	54	52	48	39	35	33	30	28	27	25	24	21	19	16	15	13	10	
Mbo1	Mob1	-	-	-	-	-	4	1	2	5	-	1	-	-	2	-	2	-	-	5	5	3	5	-	2	-	-	2	-	-	5	-	-	
	Mob2	-	-	2	-	-	3	4	4	6	-	3	-	-	3	2	5	-	-	3	2	-	7	3	3	-	3	2	3	7	2	-		
	Mbv1	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	-	-	-	2	-	2	-	-	1	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-		
	Mbv2	-	-	-	-	-	-	2	2	3	-	5	4	-	-	4	4	-	-	3	4	-	7	4	-	-	-	-	-	-	3	4	-	
	Mbv3	-	-	2	-	-	5	3	3	4	-	5	5	5	4	-	5	-	3	4	4	-	6	6	4	-	2	2	2	2	6	-	-	
	Mov1	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	3	-	2	2	-	2	-	2	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mov2	-	-	-	-	-	-	2	2	4	-	5	-	4	6	2	4	7	2	3	6	2	6	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
	Mov3	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	2	-	-	4	5	4	-	-	-	-	-	7	-	1	-	2	-	-	-	-	3	-	-
Mbo2	Mbo1	-	-	2	-	-	4	-	3	-	4	-	-	3	-	-	-	-	-	6	5	2	4	-	-	-	-	4	-	-	5	-	-	
	Mbo2	-	-	2	-	-	2	-	2	2	-	1	-	-	3	2	6	2	-	3	3	4	6	2	2	-	-	3	-	3	6	3	-	
	Mbv1	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	2	-	2	2	2	2	2	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mbv2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	4	4	-	-	3	2	-	6	2	-	-	-	-	-	-	2	3	-	1
	Mbv3	-	-	1	-	-	4	3	3	5	-	3	5	2	3	-	2	-	3	3	5	-	5	3	2	-	2	-	-	2	5	-	-	
	Mov1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	2	-	2	2	-	2	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mov2	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	5	1	4	5	-	3	2	2	4	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
	Mov3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	4	4	3	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	2	-	-	2	-	-	
Mbv1	Mbo1	-	-	1	3	-	-	2	1	-	2	-	-	2	2	-	6	-	-	3	6	-	-	5	-	1	-	-	-	-	-	3	-	
	Mbo2	-	-	-	-	-	2	3	2	-	4	-	-	2	-	4	7	-	-	1	4	3	2	7	2	2	-	-	-	-	-	-	2	
	Mbv1	2	-	-	2	-	-	1	2	1	1	3	-	-	2	-	1	3	3	2	2	2	2	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mbv2	-	-	2	2	-	2	-	2	4	-	5	6	-	5	4	4	3	5	3	4	-	5	5	-	-	-	-	-	-	3	2	-	1
	Mbv3	-	-	1	1	-	4	3	3	4	-	4	4	4	3	-	4	-	3	3	3	-	5	4	3	-	-	2	-	2	7	-	-	
	Mov1	3	-	-	-	-	-	-	-	4	2	2	-	-	3	2	4	4	-	2	2	2	3	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mov2	-	-	-	-	-	-	2	2	4	3	5	-	-	5	3	3	5	-	2	6	3	5	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
	Mov3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	4	4	4	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
Mbv2	Mbo1	-	-	-	2	-	-	1	1	-	-	-	-	1	2	-	7	-	-	2	4	-	5	4	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
	Mbo2	-	-	-	-	-	2	2	2	-	4	-	-	1	-	6	7	-	-	1	2	2	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mbv1	2	-	-	3	-	-	2	2	2	2	2	-	2	-	2	3	2	3	2	-	6	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mbv2	-	-	-	4	-	3	-	3	3	-	4	6	-	6	5	5	4	6	4	3	-	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mbv3	-	-	2	5	-	3	3	2	3	2	4	4	-	4	4	2	4	3	2	2	-	3	6	3	-	1	2	-	5	5	-	-	
	Mov1	-	-	-	3	-	-	-	2	3	5	2	-	-	3	2	4	5	-	2	1	2	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mov2	-	-	-	3	-	-	2	4	-	5	4	-	-	5	3	3	7	-	2	4	-	7	5	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
	Mov3	-	-	-	4	-	-	3	3	-	3	2	-	-	3	4	2	6	3	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
Mbo1	-	-	-	2	-	-	2	2	2	4	-	-	-	2	4	2	7	-	3	5	-	5	4	-	-	-	-	-	-	3	-	-		

4. CONCLUSÕES

1. A resposta imune induzida por *Moraxella* sp. parece ser mediada por múltiplos antígenos de superfície dos quais diversos são compartilhados por *M. bovis*, *M. bovoculi*, *M. ovis* e podem representar potenciais antígenos para o desenvolvimento de vacinas de subunidade.
2. Antígenos espécie-específicos parecem desempenhar importante papel na resposta imune do hospedeiro e também devem ser considerados na seleção de antígenos vacinais.
3. Os resultados apresentados apontam a necessidade de seleção de cepas de *M. bovoculi* e *M. ovis* para composição em conjunto de uma unidade antigênica vacinal a fim de conferir proteção satisfatória frente ao desafio das três espécies implicadas na etiologia de IBK.
4. O perfil de reatividade cruzada de cepas *M. bovis* bem como da vacina comercial incluída neste estudo em relação a cepas de *M. ovis* sugerem que vacinas comerciais essencialmente constituídas por cepas de *M. bovis*, utilizadas para prevenir surtos de oftalmia contagiosa ovina, embora sem recomendação, não induzem resposta imune satisfatória nesta espécie.
5. A análise por citometria de fluxo é uma excelente ferramenta para investigação de perfis de reatividade cruzada e deve ser considerada na seleção de cepas circulantes com potencial uso vacinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACQUISTAPACE, S. **Proteínas de membrana externa de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* como componentes de vacunas contra la queratoconjuntivitis bovina.** 2014.70f. Monografia (graduação)– Curso de licenciatura em Bioquímica. Instituto de Investigações Biológicas Clemente Estable, Montevideo- Uruguai.
- 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.
- 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. 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.; BALL, L. M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other moraxella by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 532-534, 2007.
- 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-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 125, n. 3-4, p. 274-283, Dec., 2007b.
- 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. et al. Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM 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**, 4thed., Iowa: Blackwell Publishing, 2010b. Cap. 24, p. 469-481.

ANGELOS, J. A. Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, p. 61–79, 2015.

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.

BAPTISTA, P. J. H. P. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **British Veterinary Journal**, v. 135, n. 12, p. 225-242, Aug., 1979.

BARTOS A. 2011. Culturing pinkeye lesions: *Moraxella bovis* vs. *Moraxella ovis*. Dairy herd management. Disponível em: <<http://www.cattlenetwork.com/bovine-vet/culturing-pinkeye-lesions-moraxella-bovis-vs-moraxella-ovis-114035269.html>>. Acesso em 15 mai. 2015.

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.

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.

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/Jun., 2014.

CARMO, P. M. S. et al. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa bovina e hemonose causando mortalidade em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 374-378, Mai., 2011.

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, K.; TURFREY, B. A. Exposure of bovine cornea to different strains of *Moraxella bovis* and to other bacterial species *in vitro*. **Journal of Comparative Pathology**, p. 95, p. 415–423, 1985.

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.

COHEN, J.M. et al. Lack of cross-protection against invasive pneumonia caused by heterologous strains following murine *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonisation despite whole cell ELISAs showing significant cross-reactive IgG. **Vaccine**, v.31, p.2328-2332, 2013.

- 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.
- 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.
- 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.
- ELAD, D.; YERUHAM, I.; BERNSTEIN, M. *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 35, n. 1-10, p. 431-434, Jan./Dec., 1988.
- 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 characterisation of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. **Journal Bacteriology**, v. 183, p.6717-6720, 2001.
- FENWICK, B. et al. Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 315-324, 1996.
- FRANK, S. K.; GERBER, J. D. Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 269-271, Feb., 1981.
- 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.
- 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.
- FUNK, L. et al. A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. **Vaccine**, v. 27, n. 34, p. 4585-4590, Jul., 2009.
- 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.
- GERHARDT, R. R. et al. The role of face flies in an episode of infectious Bovine Keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, p. 156-159, 1982.
- 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. Ceratoconjuntivite bovina infecciosa. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds). **Doença de ruminantes e eqüídeos**. 3 ed., Santa Maria: Palloti, 2007, v. 1, p.267-278.

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

GILSDORF, J. R. Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5053-5059, 1998.

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.

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

HUGHES, D. E.; PUGH, G. W. Jr; McDONALD, T. J. Ultraviolet radiation and *Moraxella bovis* in the etiology of bovine infectious keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 1331-1338, 1965.

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.

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. 10-17. Jan., 1989.

KAKUDA T. et al. Molecular cloning and characterisation of a 79-kDa iron-repressible outer-membrane protein of *Moraxella bovis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 225, p.279-284, 2003.

KOPECKY, K. E.; PUGH, JR G. W.; MCDONALD, B. S. Infectious bovine keratoconjunctivitis: contact transmission. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 622-624, 1986.

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

LEVISOHN, S. et al. Diagnosis of a mixed mycoplasma infection associated with a severe outbreak of bovine pinkeye in young calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 579-581, 2004.

LIBARDONI, F. et al. *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.

LOY J. D.; BRODERSEN B. W. *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 6, p. 761-768, 2014.

MABONI G. et al. Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 545-549, 2015.

MARGATHO, L. F. F.; OKAMOTO, F.; FERRARI, C. I. L. *Branhamella ovis* como agente etiológico da ceratoconjuntivite infecciosa em ovinos da raça Santa Inês. **Biológico**, v. 68, n. 1/2, p. 1-4, 2006.

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.

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

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.

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.

NAKAGE, A.P.M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, jul-ago, 2005.

Newport Laboratories. 2012. *Moraxella bovoculi* update on the "new pinkeye": reports of year-round incidence. Disponível em:
<<http://www.newportlabs.com/sites/default/files/NL4380%20Pinkeye%20Tech%20Bulletin.pdf>>. Acesso em 17 mai. 2015.

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. Outer membrane protein antigens of *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.1419-1421, 1986.

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

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.

- PINHEIRO, J. E. P. et al. Ocorrência e efeitos da ceratoconjuntivite infecciosa na filiação de touros em teste de progênie de bovinos da raça Hereford e Charolosa. **Anuário Técnico Instituto de Pesquisas Zootécnicas Francisco Osório**, v. 9, p. 135-143, 1982.
- 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.
- 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., 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. 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.
- PUNCH, P. I.; SLATTER, D. H. A review of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Bulletin**, v. 54, p. 193-207, 1984.
- PRIETO, C.I.; AGUILAR, O.M.; 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, p.213-223, 1999.
- PRIETO, C.I. et al. Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound *Moraxella bovis* pili. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2-3, p.157-168, 2003.
- ROGERS, D. G.; CHEVILLE, N. F.; PUGH G. W. Conjunctival lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. **Veterinary Pathology**, v. 24, p. 554-559, 1987.
- ROSENBUSCH, R. F. Influence of mycoplasma preinfection on the expression of *Moraxella bovis* pathogenicity. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 1621-1624, 1983.
- ROSENBUSCH, R. F.; OSTLE, A. G. *Mycoplasma bovoculi* infection increases ocular colonization by *Moraxella ovis* in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1214-1216, 1986.
- 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.
- RUEHL, W. W. et al. Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas *in vitro*. **Molecular Microbiology**, v. 7, p. 285-288, 1993.

SCHNEE, C. et al. Point prevalence of infection with *Mycoplasma bovoculi* and *Moraxella* spp. in cattle at different stages of infectious bovine keratoconjunctivitis. **The Veterinary Journal**, v. 203, p. 92–96, 2015.

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.

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. Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated with infectious bovine keratoconjunctivitis in Uruguay. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 595-597, 2012.

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.

SOSA, V. et al. Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from infectious bovine keratoconjunctivitis cases. **The Journal Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 9, p. 1028-1032, 2015.

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

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

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

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

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

WILCOCK B. P. C. Infectious bovine keratoconjunctivitis. In: Maxie M.G. (Ed). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, v. 1, p. 492-493.

APÊNDICES

Apêndice A- Proteínas potencialmente antigênicas identificadas em *Moraxella* spp. de importância para certoconjuntivite infecciosa bovina.

Massa molecular (kDa)	Proteína	Espécie identificada	Função	Referência
15-20	PiliA	<i>Moraxella</i> spp.	Adesão, colonização, "twitching motility"	Strom e Sand Lory, 1993
17	Fur (<i>ferric uptake regulator Protein</i>)	<i>M. bovis</i>	Associada ao sistema de aquisição de ferro	Kakuda et al., 2003
15,8; 20,1; 28; 30; 34,7; 39; 47	OMP	<i>M. bovis</i>	Integridade, permeabilidade, adaptação do patógeno ao ambiente	Prieto et al., 1999
	OMP38	<i>M. bovoculi</i>	Integridade, permeabilidade, adaptação do patógeno ao ambiente	Acquistapace, 2014
45,8; 47,9	OMP-CD	<i>M. bovis</i> ; <i>M. bovoculi</i>	Integridade, permeabilidade, adaptação do patógeno ao ambiente	Acquistapace, 2014
66	PLP- fosfolipase B	<i>M. bovis</i>	Lise celular	Farn et al., 2001
69	Chaperona DnaK	<i>M. bovis</i> ; <i>M. bovoculi</i>	Estabilização de proteínas desnaturadas	Acquistapace, 2014
71	OMP	<i>M. bovis</i>	Integridade, permeabilidade, adaptação do patógeno ao ambiente	Ostle e Rosenbush, 1986
79	IrpA (OMP)	<i>M. bovis</i>	Associada ao sistema de aquisição de ferro	Kakuda et al., 2003
98,4	MovA (citotoxina RTX de <i>M. ovis</i>)	<i>M. ovis</i>	Exotoxina formadora de poros em membrana de células alvo	Cerny et al., 2006
98,8	MbxA(citotoxina RTX de <i>M. bovis</i>)	<i>M. bovis</i>	Exotoxina formadora de poros em membrana de células alvo	Angelos et al., 2001
104	OMP104	<i>M. bovis</i>	Associada ao sistema de aquisição de ferro	Fenwick et al., 1996

OMP (*outer membrane proteins*)- Proteínas de membrana externa

Apêndice B- Análise de proteínas imunodominantes e conservadas entre cepas de *Moraxella* spp., detectadas pela técnica de Western blotting. A) Membrana de nitrocelulose corada com corante cromogênico na qual os extratos proteicos totais de cepas de *Moraxella* spp. (1 ao 8) foram incubados com antissoro produzido contra a cepa Mbv3 (*M. bovoculi*) (1:100) e com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:1000 Sigma-Aldrich) como anticorpo secundário. MW: marcador de peso molecular (kDa) (Bio-Rad Laboratories); 1-2: Mbo1 e Mbo2 (*M. bovis*); 3-5: Mbv1, Mbv2 e Mbv3 (*M. bovoculi*) 6-8: Mov1, Mov2 e Mov3 (*M. ovis*), respectivamente. B) Histograma referente à coluna da amostra 5, onde os picos representam, em pixels, a intensidade de reconhecimento de cada proteína pelo antissoro.

