

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ANIMAIS DA RAÇA
HEREFORD CRIADOS NA REGIÃO SUL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
DURANTE SURTOS DE CERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA BOVINA**

Helena Brocardo Comin

Pelotas, 2018.

Helena Brocardo Comin

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ANIMAIS DA RAÇA
HEREFORD CRIADOS NA REGIÃO SUL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
DURANTE SURTOS DE CERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Área de conhecimento: Melhoramento Animal).

Orientador: Pesq. PhD. Fernando Flores Cardoso
Co-orientadoras: Pesq. Dr. Bruna Pena Sollero
Pesq. Dra. Emanuelle Baldo Gaspar

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C733c Comin, Helena Brocardo

Caracterização fenotípica e genotípica de animais da raça Hereford criados na região sul do estado do Rio Grande do Sul durante surtos de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina / Helena Brocardo Comin ; Fernando Flores Cardoso, orientador ; Bruna Pena Sollero, Emanuelle Baldo Gaspar, coorientadores. — Pelotas, 2018.

115 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Bovinocultura de corte. 2. Identificação etiológica. 3. Diversidade genética. 4. Estudo de associação genômica ampla. I. Cardoso, Fernando Flores, orient. II. Sollero, Bruna Pena, coorient. III. Gaspar, Emanuelle Baldo, coorient. IV. Título.

CDD : 636.213

Helena Brocardo Comin

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ANIMAIS DA RAÇA
HEREFORD CRIADOS NA REGIÃO SUL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
DURANTE SURTOS DE CERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA BOVINA**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23 de fevereiro de 2018

Banca examinadora:

PhD. Fernando Flores Cardoso (Orientador)
Pesq. Embrapa Pecuária Sul - CPPSul

Profa. Dra. Arione Augusti Boligon
Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Dra. Emanuelle Baldo Gaspar
Pesq. Embrapa Pecuária Sul - CPPSul

Prof. Dr. João Rodrigo Gil de los Santos
Universidade Federal de Pelotas – UFPel

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais Luiz Antônio e Carmen por todo amor, dedicação e apoio incondicional, sempre acreditando no meu potencial e me instigando a seguir em frente. Agradeço ao meu Irmão Alexandre por todo o carinho ofertado, meu companheiro.

À Universidade Federal de Pelotas e Embrapa Pecuária Sul pelo suporte na minha formação acadêmica.

Agradeço de coração a todos os meus mestres até aqui, porém não posso deixar de citar alguns:

- As pesquisadoras, Coorientadoras e amigas, Bruna Pena Sollero e Emanuelle Baldo Gaspar, nas quais sempre encontrei apoio, incentivo, paciência com as minhas indecisões e dúvidas, só tenho a dizer muito obrigada por tudo.
- Ao orientador, Dr. Fernando Flores Cardoso, pelo apoio, amizade, serenidade e pelas lições profissionais nesses anos de convívio.
- Ao Professor João Rodrigo, por auxiliar no desenvolvimento e execução deste projeto e pelo empréstimo de seu laboratório.
- A querida Renata Costa Schramm, és uma grande companheira na pesquisa, modelo de clareza, objetividade e de olhar carinhoso.
- Ao Robert Domingues, por todas as exigências, confiança, boa vontade e amizade, que contribuiu de forma extraordinária para a realização deste trabalho. Levo ensinamentos além do intelectual, pois aprendi a não me subestimar, mesmo que muitas vezes não entenda no momento o que fazer.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioinformática e Estatística Genômica - Embrapa, que proporcionaram momentos únicos, fossem de debates ou de descontração.

Aos colegas do departamento de Sanidade Animal – Embrapa, pelo acolhimento, pela amizade. Pelas saídas a campo e pela ajuda na execução deste trabalho, Rossana e Bernardo – Obrigada.

A CAPES, pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação e o desenvolvimento deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, pelos conhecimentos adquiridos durante a realização do curso de mestrado.

Resumo

COMIN, Helena Brocardo. **Caracterização fenotípica e genotípica de animais da raça Hereford criados na região sul do estado do Rio Grande do Sul durante surtos de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. 2018. 115f.** Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Animal) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Esta dissertação foi dividida em quatro capítulos, tendo como principais objetivos: i) realizar a identificação bacteriológica dos agentes envolvidos na Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB), por meio de diferentes técnicas: análise morfo-tintorial e bioquímica, Espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voo (MALDI-TOF), Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento. ii) avaliar a diversidade genética de bactérias das espécies *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* isoladas de surtos de CIB entre 2015 e 2017, utilizando as técnicas de ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), RAPD-PCR (*random amplification of polymorphic DNA*) e uma variação do RAPD-PCR com os *primers* JWP1 e JWOPA07. iii) estimar os parâmetros e valores genéticos por meio da avaliação tradicional pelo modelo animal para a incidência de CIB. iv) realizar estudo de associação ampla do genoma (GWAS) para identificação de regiões genômicas e SNPs mais representativos para susceptibilidade à CIB. Logo no início do surto de CIB amostras de secreções oculares e nasais foram coletadas de bovinos da raça Hereford para possibilitar a identificação do agente bacteriológico causador da enfermidade, com isso confirmar o surto de CIB. Os animais eram provenientes de cinco fazendas, criados no sul do estado do Rio Grande do Sul. Foram realizadas quatro avaliações, com intervalo médio de 30 dias. O monitoramento teve como finalidade a realização da fenotipagem com relação à susceptibilidade à doença, por meio do acompanhamento da evolução dos surtos de CIB nas propriedades, a partir da atribuição de escores de lesão ocular. Foram atribuídos escores para as lesões de CIB, para cada um dos olhos, em uma escala de zero a quatro, na qual zero indicava o olho normal e quatro o estágio mais avançado da doença, implicando em perda ocular. As melhores concordâncias obtidas entre os métodos de identificação bacteriológica estudada foram à identificação por MALDI-TOF e a identificação molecular (PCR), confirmadas por sequenciamento, a partir do DNA extraído das colônias de *Moraxella* spp. Ademais, foi confirmada a existência de variabilidade genética entre as cepas de *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* isoladas de bovinos da raça Hereford, acometidos por CIB, pertencentes a cinco diferentes municípios situados no estado do Rio Grande do Sul. Os coeficientes de herdabilidade preditos foram de 0,14, 0,096 e 0,099 para as categorias (c_2, c_3 e c_9) para incidência a CIB. Os estudos de GWAS apontaram janelas genômicas significativas nos cromossomos 3, 11, 14, 18, 26 e 27 associados à CIB. As análises de enriquecimento funcional revelaram oito termos significativos ($p < 0,05$) associados com a susceptibilidade a CIB: *Babesia*, *Plasmodium vivax*, *Babesiosis*, *Blood bactericidal activity*, *Retinal cone photoreceptor cells*, *Animal nutritional physiological phenomena*, *COS cells* e *5 Flanking region*. Os termos MeSH, apontam para importantes processos biológicos que estão relacionados com a expressão fenotípica das lesões ocorridas pela CIB. Concluindo, as análises fenotípicas e genômicas realizada ao longo deste estudo podem auxiliar na concepção de estratégias de prevenção e tratamento contra o CIB, podendo colaborar com estratégias de seleção por animais resistentes a CIB.

Palavras – chave: bovinocultura de corte; identificação etiológica; diversidade genética; estudo de associação genômica ampla.

Abstract

COMIN, Helena Brocardo. **Phenotypic and genotypic characterization of Hereford breed animals raised in the southern region of the State of Rio Grande do Sul during outbreaks of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis**. 2018. 115f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Animal) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

This dissertation was divided into four chapters, with the following main objectives: i) to carry out the bacteriological identification of the agents involved in Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (IBK) by means of different techniques: morpho-tintorial and biochemical analysis, mass spectrometry with ionization source and matrix-assisted laser desorption and time-of-flight mass analyzer (MALDI-TOF), polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. ii) to evaluate the genetic diversity of *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi* bacteria isolated from IBK outbreaks between 2015 and 2017, using ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), RAPD-PCR (*random amplification of polymorphic DNA*) and a variation of the RAPD-PCR with *primers* JWP1 and JWOPA07. iii) to estimate the genetic parameters and values through the traditional evaluation by the animal model for the incidence of IBK. iv) carry out genome association study (GWAS) to identify genomic regions and most representative SNPs for susceptibility to IBK. At the beginning of the outbreak of IBK samples of ocular and nasal secretions were collected from Hereford cattle to enable the identification of the bacteriological agent causing the disease, thus confirming the IBK outbreak. The animals came from five farms, located in the southern of Rio Grande do Sul state. Four evaluations were performed, with an average interval of 30 days. The purpose of the monitoring was to perform the phenotyping with regard to susceptibility to the disease, by monitoring the evolution of IBK outbreaks in the properties, from the attribution of ocular lesion scores. Scores were assigned to IBK lesions for each eye on a scale of zero to four, in which zero indicated the normal eye and four the most advanced stage of the disease, implying ocular loss. The best concordances obtained between the methods of bacteriological identification studied were the identification by MALDI-TOF and the molecular identification (PCR), confirmed by sequencing, from the DNA extracted from the colonies of *Moraxella* spp. In addition, the existence of genetic variability between *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi* strains isolated from Hereford cattle, affected by IBK, belonging to five different municipalities located in the state of Rio Grande do Sul was confirmed. The predicted heritability coefficients were 0.14, 0.096 and 0.099 for the categories (c2, c3 and c9) for incidence at IBK. GWAS studies showed significant genomic windows on chromosomes 3, 11, 14, 18, 26 and 27 associated with IBK. Functional enrichment analyzes revealed eight significant ($p < 0.05$) terms associated with IBK susceptibility: *Babesia*, *Plasmodium vivax*, *Babesiosis*, *Bood bactericidal activity*, *Retinal cone photoreceptor cells*, *Animal nutritional physiological phenomena*, *COS cells* e *5 Flanking region*. The terms MeSH, point to important biological processes that are related to the phenotypic expression of the lesions occurred by IBC. In conclusion, the phenotypic and genomic analyzes carried out throughout this study may help in the design of strategies for prevention and treatment against CIB, and may collaborate with selection strategies for CIB resistant animals.

Keywords: beef cattle; etiological identification; genetic diversity; genetic parameters; genome-wide association study.

Lista de Figuras

Figura 1: Eletroforese em agarose 1, 8%, produto da reação de PCR digerido com RsaI.....	40
Figura 2: Características macroscópicas típica de <i>Moraxella</i> spp: colônias circulares, lisas, esbranquiçadas, pequenas e hemolíticas.	41
Figura 3: Cocobacilos gram negativos - A; Diplococos gram negativos – B.	42
Figura 4: Distribuição dos resultados de identificação dos isolados de <i>Moraxella</i> spp. por meio das quatro diferentes técnicas: A) Análise morfo-tintorial e bioquímico; B) MALDI-TOF; C) PCR; D) Sequenciamento.	43
Figura 5: Comparação dos resultados entre o método convencional (morfo/bioquímico) e PCR para identificação dos isolados de <i>Moraxella</i> spp.	49
Figura 6: Comparação dos resultados entre o MALDI-TOF e PCR para identificação dos isolados de <i>Moraxella</i> spp.	50
Figura 7: Comparação dos resultados entre o PCR e sequenciamento do DNA para identificação dos isolados de <i>Moraxella</i> spp.	51
Figura 8: Morfologia dos isolados de <i>Moraxella bovis</i> , <i>Moraxella bovoculi</i> e <i>Moraxella ovis</i> , identificadas pela técnica de PCR e confirmadas por sequenciamento.....	52
Figura 9: Dendrograma representando as relações genéticas entre isolados de <i>Moraxella bovis</i> e <i>Moraxella bovoculi</i> pelo método do UPGMA. Valores de bootstrap representados na árvore (2000 <i>bootstrap</i>).	66
Figura 10: Distribuição dos valores genéticos preditos (EBVs) para susceptibilidade à CIB, para os animais classificados na categoria c_2.	81
Figura 11: Gráfico de <i>Manhattan</i> com os resultados para o estudo de associação ampla do genoma realizado pelo método Bayes B ($\pi=0.99$) para a susceptibilidade a CIB.	91

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características diferenciais entre espécies de <i>Moraxella</i> spp.	22
Tabela 2: Características diferenciais entre espécies de <i>Moraxella</i> spp.	36
Tabela 3: Reagentes utilizados para a amplificação individual de DNA de amostras do gênero <i>Moraxella</i>	39
Tabela 4: Condições de amplificação para as amostras do gênero <i>Moraxella</i>	39
Tabela 5: Identificação dos agentes envolvidos na CIB por análise tradicional e por MALDI-TOLF.....	47
Tabela 6: Comparação entre a identificação obtida de acordo com as distintas técnicas: análise morfo-tintorial e bioquímica, MALDI-TOF, PCR e sequenciamento.	47
Tabela 7: Características moleculares das amostras de <i>Moraxella</i> spp. isoladas de CIB, em cinco municípios do Rio Grande do Sul.....	60
Tabela 8: <i>Primers</i> RAPD testados para diversidade genética de <i>Moraxella</i> spp.....	61
Tabela 9: Reação utilizada para a amplificação por RAPD, para cada amostra, para seleção dos <i>primers</i>	62
Tabela 10: Reação utilizada para a amplificação por JWP1-JWOPA07 e ERIC-PCR	63
Tabela 11: Escores de lesão de CIB.	74
Tabela 12: Número de animais diagnosticados com diferentes escores de severidades de lesão para CIB em cada uma das quatro avaliações.	78
Tabela 13: Número de animais diagnosticados com diferentes graus de CIB, classificados em duas, três e nove categorias.	79
Tabela 14: Média a posteriori para variâncias genética aditiva direta (σ^2_a), de ambiente permanente (σ^2_p) e residual (σ^2_e), e herdabilidades direta (h^2) para as categorias (c_2, c_3, c_9) para incidência a CIB.	80

Tabela 15: Descrição das janelas genômicas que explicam pelo menos 0,20% da
variância genética total para a susceptibilidade a CIB em bovinos da raça Hereford.
.....91

Tabela 16: Termos MeSH relacionados com a susceptibilidade a CIB em bovinos
Hereford com seus devidos *p-values* ($p<0,05$).94

Sumário

1 Introdução	16
2 Revisão de literatura	18
2.1 Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina	18
2.1.1 Epidemiologia	18
2.1.2 Etiologia	19
2.1.3 Fisiopatogênia	19
2.1.4 Sinais clínicos	20
2.1.5 Diagnóstico	21
2.1.6 Controle e profilaxia	24
2.1.7 Susceptibilidade aos antimicrobianos	25
2.1.8 Diversidade genética em <i>Moraxella</i> spp.	26
2.2 Melhoramento genético de bovinos de corte	27
2.2.1 Parâmetros genéticos	29
2.2.2 Marcadores moleculares no melhoramento genético animal.....	29
2.3 Estudos de associações ampla do genoma (GWAS).....	30
3 Objetivos	32
4 Capítulo 1 – Comparação entre diferentes técnicas de identificação bacteriológica de cepas de <i>Moraxella</i> spp. envolvidas em casos clínicos de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina em bovinos da raça Hereford	33
4.1 Introdução	33
4.2 Material e Métodos.....	34
4.2.1 Coleta das amostras	34
4.2.2 Identificação bacteriológica por meio de análises morfológica e testes bioquímicos.....	35
4.2.3 Identificação bacteriológica por meio da técnica MALDI-TOF	36
4.2.4 Identificação bacteriológica por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)	37

4.2.5 Sequenciamento de DNA dos isolados de <i>Moraxella</i> spp.	40
4.3 Resultados e Discussão.....	41
4.3.1 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por meio de análise morfológica e testes bioquímicos	41
4.3.2 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por MALDI-TOF	44
4.3.3 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por reação em cadeia da polimerase (PCR)	45
4.3.4 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por sequenciamento de DNA dos isolados de <i>Moraxella</i> spp.....	46
4.3.5. Comparação entre as técnicas de identificação dos isolados de <i>Moraxella</i> spp.....	46
4.3.6 Visão geral entre as técnicas morfológica/bioquímica, MALDI-TOF, PCR e sequenciamento.	52
4.4 Conclusões	54
5 Capítulo 2 – Diversidade genética de amostras de <i>Moraxella bovis</i> e <i>Moraxella bovoculi</i> isoladas de bovinos Hereford pertencentes a cinco municípios da região do Pampa Gaúcho	59
5.1 Introdução	59
5.2 Material e Métodos.....	60
5.2.1 Isolados bacterianos	60
5.2.2 Extração de DNA dos isolados bacterianos	61
5.2.3 Amplificação do DNA por PCR	61
5.2.4 Análise estatística dos dados	63
5.3 Resultados e Discussão.....	64
5.4 Conclusões	68
6 Capítulo 3 – Estimação dos parâmetros e valores genéticos para a susceptibilidade à Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina	72
6.1 Introdução	72
6.2 Material e Métodos.....	74

6.2.1 Dados	74
6.2.2 Análise estatística	76
6.3 Resultados e Discussões	78
6.4 Conclusões	82
7 Capítulo 4 – Estudo de associação genômica ampla (GWAS) para susceptibilidade à Ceratoconjuntivite Infecciosa bovina	85
7.1 Introdução	85
7.2 Material e Métodos.....	86
7.2.1 Dados fenotípicos	86
7.2.2 Dados genômicos	87
7.2.3 Estudos de associação ampla do genoma	88
7.2.4 Análise de enriquecimento funcional	89
7.3 Resultados e Discussão.....	90
7.3.1 Estudo de associação genômica ampla (GWAS)	90
7.3.2 Análise de enriquecimento funcional utilizando os termos MeSH.....	92
7.3.3 Genes candidatos	95
7.4 Conclusões	97
8 Considerações gerais.....	102
Referências	103
Anexos	112

1 Introdução

O Brasil ocupa lugar de destaque na pecuária de corte bovina. Possui um dos maiores rebanhos comerciais a nível mundial, com aproximadamente 209 milhões de cabeças (ABIEC, 2016). O Brasil é classificado como maior exportador de carne bovina no mundo, em 2015, alcançou o volume superior a 1,8 milhão de toneladas de carne exportada (ABIEC, 2016).

Em paralelo ao aumento da produção de pecuária por área, problemas sanitários são em grande maioria limitantes da produtividade e demandam intenso uso de insumos químicos, nem sempre eficazes, no tratamento das enfermidades. Entre as principais enfermidades que afetam a produtividade em bovinos está a Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB).

A CIB é uma das mais importantes doenças oculares que afetam bovinos, trata-se de uma enfermidade estacional, com distribuição mundial e prevalência elevada, principalmente na raça Hereford (GIL TURNES, 2001). O agente etiológico da CIB é *Moraxella bovis*, uma bactéria Gram-negativa, amplamente disseminada e altamente contagiosa (McCONNEL et al., 2007).

A conduta terapêutica e profilática frente à CIB inclui o uso de antimicrobianos e vacinas, respectivamente. No entanto, a profilaxia é, em geral, prejudicada por situações de ineficácia de vacinas comercialmente disponíveis para CIB (O'CONNOR et al., 2011). Brown et al. (1998) explanaram em seu estudo que a ineficiência das vacinas pode se dar pela variação genética e antigênica entre as cepas de *Moraxella bovis* e a presença de outros microrganismos envolvidos na enfermidade. A variabilidade genética bacteriana pode ser confirmada por estudos dos fragmentos de DNA de tamanhos distintos, gerados a partir da amplificação de sequências repetidas existentes no genoma bacteriano, por meio da utilização de oligonucleotídeos específicos pelo PCR (SAIKI et al., 1988).

Tradicionalmente, os programas de melhoramento genético em bovinos de corte priorizaram características relacionadas à capacidade de crescimento e à eficiência reprodutiva dos animais (O'NEILL et al., 2010; DECKER et al., 2012). Como alternativas para manter-se competitivo no mercado da carne, além das características tradicionalmente enfatizadas, estão sendo consideradas nas avaliações genéticas características relacionadas à eficiência alimentar e à resistência dos animais a adversidades ambientais, doenças e parasitas (CARDOSO

et al., 2013; NIETO et al., 2013). Nesse contexto o melhoramento animal tem ação fundamental para o aumento da eficiência produtiva e adaptação ao ambiente, incluindo resistência a enfermidades, sem necessidade de requerer grandes investimentos e intensificação do uso de insumos.

Para planejar e executar um programa de melhoramento genético de bovinos de corte se faz necessário estimar parâmetros genéticos, com base em dados fenotípicos e de pedigree, sujeitos à influências ambientais e de manejo (FREITAS, 2000). Conhecer os parâmetros genéticos das características a serem utilizadas como critérios de seleção é de fundamental importância, pois com sua estimação é possível prever respostas diretas e correlacionadas à seleção, elaborar índices e prever o valor genético dos animais (FARIA et al., 2007).

Com o advento do sequenciamento do genoma bovino (ELSIK, et al., 2009) e a evolução das tecnologias voltadas para a genética molecular, inúmeros polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) foram descobertos ao longo de todo o genoma desta espécie, auxiliando assim na identificação de regiões cromossômicas (QTL - *Quantitative Trait Loci*), que contêm genes que influenciam na expressão de fenótipos (FALCONER e MACKAY, 1996). Tais estudos são denominados estudos de associação ampla do genoma (GWAS - *Genome-Wide Association Study*), os quais possibilitam a identificação de SNPs relacionados às características estudadas. Desta forma estes estudos podem explicar parte da variação genética de determinado fenótipo e indicam os marcadores fortemente associados ao fenótipo, ou seja, em desequilíbrio de ligação com os genes que afetam a característica em questão (GODDARD e HAYES, 2009).

2 Revisão de literatura

2.1 Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina

2.1.1 Epidemiologia

A Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB) é uma das doenças oculares mais frequentemente detectada em ruminantes (TORRES, 2013). Esta enfermidade foi diagnosticada na maioria dos estados brasileiros e está amplamente disseminada na região sul do Rio Grande do Sul (GIL TURNES, 2001), afetando principalmente animais de raças europeias (CONCEIÇÃO e TURNES, 2003).

Embora a mortalidade por CIB não seja elevada, os prejuízos ocasionados são representados pela redução no ganho de peso, queda na produção de leite dos animais, gastos com tratamentos repetitivos, desvalorização comercial e eventuais descartes de animais que apresentam sequelas oculares graves e permanentes (GEORGE, 1990; McCONNEL et al., 2007). É caracterizada por alta morbidade, pois pode afetar até 80% do rebanho (POSTMA et al., 2008).

Trata-se de uma doença estacional, com distribuição mundial e, geralmente, com prevalência elevada (McCONNEL et al., 2007). Afeta animais de todas as idades, porém, animais jovens são geralmente mais suscetíveis (KILLINGER, 1977). Segundo Snowden et al. (2005), todas as raças bovinas são suscetíveis à infecção, porém a incidência de CIB é maior na raça Hereford. Estes mesmos autores relatam em seus estudos com bovinos de raça Hereford, que a correlação fenotípica e genotípica entre pigmentação ocular e a incidência ou resistência à CIB foi muito pequena, porém existente (SNOWDER et al., 2005). Outro fator colaborador para a maior incidência de CIB em animais Hereford é a ineficiente ação bactericida da solução lacrimal (SNOWDER et al., 2005).

A CIB comumente ocorre em forma de surtos, podendo apresentar curso agudo, subagudo e crônico, que pode acometer um ou ambos os olhos (PUNCH et al., 1985). Esta enfermidade é transmitida por contato direto entre os animais ou por vetores. Os surtos são mais frequentes no fim do verão e início de outono, coincidindo com o aumento da população de moscas, que transmitem a bactéria a animais suscetíveis (GERHARD et al., 1982). Além disso, poeira, altura de pastagens e de ervas daninhas, alimentação pulverulenta, incidência solar (raios UV), bem como a sobrecarga populacional, tendem a favorecer a ocorrência da CIB (CHAVES et al., 2008; BROWN e ADKINS, 1972). Alguns fatores podem atuar na

patogenicidade da doença, são eles: estação do ano, irritação mecânica, resposta imune do hospedeiro, patógenos concorrentes, fatores ambientais e as diferenças entre os isolados de *Moraxella bovis* principalmente em relação aos mecanismos de virulência (FRISCH, 1975; WARD e NEILSON, 1979; ALEXANDER, 2010).

2.1.2 Etiologia

A CIB tem como agente etiológico *Moraxella bovis* (HENSON e GRUMBLES, 1960) única bactéria capaz de reproduzir a doença de acordo com os postulados de Koch (KODJO et al., 1994). Postulados de Koch (1881) baseia-se na sequência de procedimentos utilizados para se estabelecer a relação causal entre um microrganismo e uma determinada doença (CASTILLO et al., 2007).

Estudos realizados sugerem que outras bactérias do gênero *Moraxella* possam estar associadas à CIB (ANGELOS, 2010a, 2010b). Esta suspeita se apoia no relato de isolamento de microrganismos semelhantes à *Moraxella bovis* nas lesões de CIB. Por muito tempo a suspeita foi que esses microrganismos seriam *Moraxella ovis* (ELAD et al., 1988). Porém, em 2007 uma nova espécie do gênero *Moraxella* foi isolada das secreções oculares e nasais de bovinos afetados pela CIB, denominada *Moraxella bovoculi* (ANGELOS et al., 2007a). Com isso, autores sugerem que a maioria das bactérias isoladas de secreções oculares de bovinos com CIB, anteriormente identificados como *Moraxella ovis*, na verdade devem ser reclassificadas como *Moraxella bovoculi* (O'CONNOR et al., 2012).

Embora haja evidências circunstanciais da participação de *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi* na patogenia da CIB, ainda não foi possível comprovar a participação na etiologia da doença (GOULD et al., 2013), pois até o presente momento não foram documentadas tentativas bem-sucedidas de cumprir os postulados de Koch com esta espécie. Com isso seu papel na fisiopatologia da CIB permanece obscuro (MAIA, 2015). Presume-se que a *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi* estejam associadas de forma secundária ao desenvolvimento da patologia em questão (GOULD et al., 2013). Desta forma, *Moraxella bovis* é o único agente etiológico reconhecido para essa doença (ANGELOS, 2010).

2.1.3 Fisiopatogênia

Moraxella bovis possui vários fatores de virulência para burlar o sistema imunológico do hospedeiro, porém apenas dois são determinantes para causar a

doença clínica: a presença de fímbrias (pili) na superfície da célula bacteriana e a secreção de toxina com propriedades hemolíticas e leucolíticas (POSTMA et al., 2008).

As fímbrias de *Moraxella bovis* constituem um dos fatores primários da patogenicidade, pois permitem a aderência da bactéria na mucosa ocular do hospedeiro, evitando que o microrganismo seja removido por secreções oculares e pelo ato de piscar (CHANDLER et al., 1981; POSTMA et al., 2008). São capazes de promover a infecção ocular e desencadear os sinais clínicos de CIB apenas as cepas que apresentarem essas estruturas de aderência em sua superfície (CHANDLER et al., 1979). Calcutt et al. (2014) observaram que o gene do pilus tipo IV, relevante para a colonização do hospedeiro, está presente na *Moraxella bovoculi*, mas ainda não se tem relatos em *Moraxella ovis*. Marrs et al. (1988) identificaram dois tipos de pili com funcionalidades distintas denominados β e α . O pili β é responsável pelo aumento da fixação das bactérias à córnea bovina e o pili α propicia a persistência da bactéria no local por mais tempo mantendo a infecção já estabelecida (MAIA, 2015). As cepas de *Moraxella bovis* que possuem pili do tipo β são mais patogênicas que as cepas que possuem pili do tipo α (RUEH et al., 1988; RUEH et al., 1993).

Além das fímbrias, as cepas patogênicas de *Moraxella bovis* sintetizam uma citotoxina denominada β hemolisina, que tem papel fundamental na patogenia da CIB. Frequentemente cepas não hemolíticas são isoladas de secreções oculares ou nasais de bovinos e, geralmente, não estão associadas com a doença clínica (BROWN et al., 1998). Alguns estudos apontam que cepas hemolíticas de *Moraxella bovis* produzem citotoxina que perfuram a membrana citoplasmática das células alvo (epiteliais, leucócitos, hemácias), o que leva à necrose e perda do epitélio da córnea (úlceras de córnea) (ANGELOS et al., 2001). *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi* apresentam o gene codificador da citotoxina (ANGELOS et al., 2007b), bem como todo o operon RTX encontrado nas cepas patogênicas de *Moraxella bovis* (ANGELOS et al., 2003).

2.1.4 Sinais clínicos

Os primeiros sinais clínicos da CIB desencadeiam-se quando cepas patogênicas de *Moraxella spp.* sintetizam fímbrias de aderência. As fímbrias são capazes de reconhecer receptores específicos presentes na conjuntiva, aderindo-se

às células (GIL TURNES, 2001). Citotoxinas com atividade enzimática provocam lesões na córnea beneficiando a entrada das bactérias, levando a uma modificação na disposição das fibras de colágeno e à necrose celular (ARAÚJO e RICCIARDI, 1988). A lise celular estimula um processo inflamatório que gera edema de córnea e provoca migração de células inflamatórias (GIL TURNES, 2001). Durante essa sucessão de eventos a gravidade das lesões oculares varia de sinais clínicos leves a casos mais graves, que apresentam lacrimejamento intenso, fotofobia, inchaço conjuntival, opacidade no centro da córnea (nébula) e ulceração (1 a 4 mm de diâmetro) (POSTMA et al., 2008). De acordo com o progresso da doença pode-se diagnosticar cegueira temporária. Caso ocorra a ruptura da córnea a cegueira é permanente no indivíduo (GIL TURNES, 2007). Tornam-se portadores crônicos aqueles animais que se recuperam dos sinais clínicos. Após a cicatrização da córnea pode haver a formação de uma leve cicatriz (MAIA, 2015).

2.1.5 Diagnóstico

2.1.5.1 Diagnóstico clínico

Lesões que se originam na área central da córnea e que progridem de forma centrífuga facilitam o diagnóstico de CIB. O diagnóstico final é feito a partir do isolamento e identificação bacteriológica da *Moraxella bovis* (MAIA, 2015).

2.1.5.2 Diagnóstico laboratorial

O material utilizado para a comprovação do diagnóstico laboratorial são os fluidos oculares e nasais de animais na fase inicial da doença. É imprescindível que esta coleta seja realizada no início do surto e em animais apresentando lesões iniciais, pois com a evolução da doença pode ocorrer contaminação da lesão por outras bactérias, o que acaba dificultando a identificação das bactérias associadas à doença (GASPAR et al., 2015).

O esquema de identificação bacteriológica clássica é baseado em um padrão de características, capaz de diferenciar um microrganismo de outros e identificá-lo exclusivamente dentro do grupo a que pertence (MELO, 2014).

2.1.5.2.1 Análise morfo-tintorial e testes bioquímicos

Os métodos clássicos de identificação bacteriológica incluem a caracterização morfológica da bactéria e de suas colônias, coloração de Gram, condições de

crescimento em meios seletivos, potencial para assimilação de certos açúcares, ocorrência de reações bioquímicas específicas, entre outras (SUTTON e CUNDELL, 2004).

As bactérias do gênero *Moraxella*, pertencentes à classe das Proteobacterias (ROSSAU et al., 1991), são caracterizadas como gram negativas, na forma de bastonetes curtos, cocobacilos ou cocos, que geralmente ocorrem aos pares (diplococos) (ANGELOS, 2010b). Os testes bioquímicos revelam reações positivas para a produção de oxidase e catalase, porém, alguns autores consideram variável para produção de catalase (VAN HALDEREN e HENTON, 2004) e negativa para fermentação de carboidratos (BROWN et al., 1998).

As características morfológicas das colônias quando estriadas em ágar sangue são as mesmas para todos os membros do gênero *Moraxella* (GOMES, 2012). Formam colônias arredondadas, lisas, com 1 a 3 mm de diâmetro, levemente esbranquiçadas e com um estreito halo de β -hemólise (PUGH e HUGHES, 1966).

O diagnóstico laboratorial é complexo, exigindo conhecimento especializado na área, podendo ser orientado pelos principais testes aplicados para caracterização da *Moraxella* spp. (Tabela 1).

Tabela 1: Características diferenciais entre espécies de *Moraxella* spp.

Análise Laboratorial	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovoculi</i>	<i>M. ovis</i>
Morfologia	CB - B	DC	C
Hemólise	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Catalase	(+ / -)	+	+
Redução de nitratos	-	+	+
Liquefação da gelatina	+	-	-
Fenilalanina desaminase	-	+	-

CB = Cocobacilos / B= Bacilos / DC = Diplococos / C = Cocos / (-) = Reação negativa / (+) = Reação positiva / (+/-) = Variável.

Fonte: adaptado de GOMES, (2012) e ANGELOS et al., (2007a).

A espécie *Moraxella bovis* apresenta pleomorfismo variado, exibindo-se aos pares ou em cadeias curtas de cocos, cocobacilos e bacilos (CONCEIÇÃO e TURNES, 2003). De acordo com os testes bioquímicos, é positiva para oxidase e variável para catalase, não reduz nitratos e degrada gelatina (BROWN et al., 1998).

As bactérias *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi* são caracterizadas como cocos, que geralmente ocorrem aos pares (diplococos) (GOMES, 2012; ANGELOS et al, 2007a). *Moraxella bovoculi* pode ser diferenciada de *Moraxella bovis* e *Moraxella ovis* pelo teste de fenilalanina desaminase (PADase), sendo a *Moraxella*

bovoculi PADase positiva enquanto a *Moraxella bovis* e *Moraxella ovis* PADase negativa (ANGELOS e BALL, 2007).

Outro teste bioquímico aplicado para diferenciação bacteriológica é o da liquefação da gelatina. Este teste é baseado na determinação a capacidade de um organismo em liquefazer a gelatina, pela produção de enzimas proteolíticas, as gelatinases (ANVISA, 2004). *Moraxella bovis* é positiva e *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* são negativas para esta reação.

Embora apenas a caracterização bioquímica não seja suficiente para identificar espécies bacterianas de forma segura (CARBONNELLE et al., 2011), esta caracterização é muito útil para que sejam verificadas as características fisiológicas das bactérias isoladas, as quais permitem a otimização de seu cultivo *in vitro*, permitindo a obtenção de melhores resultados por meio de outras técnicas mais precisas.

2.1.5.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a diferenciação entre espécies de *Moraxella* spp.

Uma alternativa para um diagnóstico confiável se dá pela identificação da espécie de *Moraxella* spp. por testes moleculares (MAIA, 2015). Para diferenciar *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* foi desenvolvido um método utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase) e enzimas de restrição (que atuam sobre sequências específicas de DNA) (ANGELOS e BALL, 2007).

A técnica de PCR consiste na amplificação de sequências específicas de DNA por meio de uma simples reação química *in vitro*. A técnica baseia-se em ciclos repetitivos de três reações que ocorrem em diferentes temperaturas, em um mesmo tubo e na presença de reagentes termoestáveis. Adiciona-se na sequência específica de DNA a ser amplificada, os reagentes iniciadores, que são dois pequenos oligonucleotídeos denominados *primers*, sintetizados para serem complementares as sequências conhecidas do DNA-alvo, acrescenta-se também grande quantidade dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e a enzima termoestável Taq DNA-polimerase, isolada de bactéria termofílica (EISENSTEIN, 1990).

Na técnica de PCR, conforme Angelos e Ball (2007), os amplicons de 650pb (pares de base) correspondem à *Moraxella bovis* e 600pb à *Moraxella bovoculi* ou *Moraxella ovis*. Para a diferenciação das espécies de *Moraxella* utiliza-se uma

enzima de restrição (*AfaI*) que cliva somente o DNA amplificado da região intergênica 16S-23S da *Moraxella bovoculi* (600pb) em um único sítio de restrição. Ou seja, para esta espécie, o DNA amplificado é digerido pela enzima de restrição resultando em dois fragmentos de 150 e 450pb. Por outro lado, os amplicons de *Moraxella bovis* e *Moraxella ovis* não são cortados pela enzima de restrição e se mantêm como uma única banda no gel (ANGELOS e BALL 2007).

2.1.5.2.3 MALDI – TOF: auxiliando no diagnóstico da CIB

Além dos testes bioquímicos e moleculares, existe um novo método para a investigação e identificação rápida da maioria das bactérias patogênicas. Este método é denominado espectrometria de massas (Mass Spectrometry - MS) com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization - MALDI) e analisador de massas do tipo tempo-de-voo (Time of Flight - TOF) (MALDI-TOF) (STEVENSON, et al. 2010). A técnica baseia-se em detectar a relação de massa/carga de um analito (ANGELETTI, 2017), permitindo a reprodutibilidade de espectros, possibilitando comparar o espectro de massas, obtido em poucos segundos, com os de referências de cepas conhecidas, proporcionando a detecção da bactéria patogênica com mais rapidez do que os métodos convencionais (SIUZDAK, 2006), auxiliando assim em um diagnóstico rápido e preciso (GOULART e RESENDE, 2013) da CIB.

2.1.6 Controle e profilaxia

Após mais de um século do primeiro relato de CIB, as medidas de controle e profilaxia disponíveis ainda têm suas limitações (CONCEIÇÃO e TURNES, 2003). As medidas terapêuticas podem ser influenciadas por inúmeros fatores, entre eles: eficácia dos antimicrobianos, custos, exigência e disponibilidade de trabalho e qualidade das instalações e assistência técnica (McCONNEL et al., 2007).

Os animais com sinais clínicos de CIB devem ser isolados e prontamente tratados, evitando desta forma que ocorram lesões permanentes de córnea do animal (COSTA et al., 2008), porém essa medida não garante a erradicação do estado de animal portador da enfermidade (BROWN et al., 1998). Segundo Gil Turnes (2001) a administração do antimicrobiano deve ser por via parenteral ou aplicado nas glândulas lacrimais, ou de forma tópica no saco conjuntival. No geral utiliza-se a administração de antibióticos e anti-inflamatórios na forma de tratamento

tópicos (aerossóis, pomadas ou pó oftalmo) (BLOOD e RADOSTITS, 1992). Porém, o efeito lacrimal auxilia na retirada do produto da conjuntiva e córnea dos animais, fazendo-se necessário repetir as aplicações (TORRES, 2013). Outra forma de administração de antibióticos e anti-inflamatórios é por via parenteral sistêmica, na qual oxitetraciclina, penicilina e florfenicol são os fármacos amplamente utilizados e são relatados como eficazes no tratamento desta enfermidade (ALLEN et al., 1995; EASTMAN et al., 1998; ANGELOS et al., 2000; GOKCE et al., 2002).

A medida profilática mais comumente aplicada para proteger os animais da CIB é a vacinação (MABONI, 2013), no entanto, frequentemente a proteção induzida pela vacina não é satisfatória. (BURNS e O'CONNOR, 2008). Estudos realizados nos Estados Unidos por Funk et al. (2009) e O'Connor et al. (2011) com vacinas autógenas contendo antígenos de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* em rebanhos bovinos, sugerem que essas vacinas são, na maior parte, ineficazes no controle de CIB. De modo igual, Angelos et al. (2010) em estudos com vacinas recombinantes apenas com antígenos de *Moraxella bovoculi* constataram que esse tipo de vacina não é eficaz no controle de CIB associada à *Moraxella bovoculi* e *Moraxella bovis*.

É também indicado o controle das moscas que atuam como vetor mecânico da enfermidade para se reduzir a incidência de CIB (REBHUN, 2000).

2.1.7 Suscetibilidade aos antimicrobianos

Antimicrobianos são largamente utilizados para o tratamento de casos clínicos de CIB, sendo a *Moraxella* spp. sensível a maioria dos fármacos. Sabe-se que existem diferenças nos padrões de suscetibilidade entre cepas isoladas em locais distintos, de um mesmo rebanho, ao longo de um surto ou de um mesmo animal (GIL TURNES e ALBUQUERQUE, 1984).

Estudos revelam que a *Moraxella bovis* é frequentemente sensível a ampicilina, cefalosporina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, nitrofurantoína, rifampicina e tetraciclina, sendo que, a resistência foi relatada à eritromicina, lincomicina e novobiocina (BROWN et al., 1998; CONCEIÇÃO et al., 2004). Até o presente momento nada consta na literatura científica sobre estudos acerca do perfil de suscetibilidade de cepas brasileiras de *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*. Nos Estados Unidos, Angelos et al. (2011) testaram a suscetibilidade da *Moraxella bovoculi* frente a antimicrobianos. De acordo com os resultados encontrados, o perfil

de suscetibilidade para as cepas de *Moraxella bovoculi* não difere dos já encontrados para *Moraxella bovis*.

É fundamental conhecer o perfil de susceptibilidade das cepas circulantes em determinada região frente aos vários antimicrobianos existentes, para que, se a enfermidade ocorrer, o tratamento realizado seja o mais adequado possível, de modo a prevenir a seleção de cepas de *Moraxella* spp. resistentes aos principais fármacos usados no tratamento dessa enfermidade.

2.1.8 Diversidade genética em *Moraxella* spp.

Todas as vacinas comercialmente disponíveis no mercado brasileiro possuem apenas antígenos de *Moraxella bovis* em suas formulações, uma vez que é considerada a causadora primária da CIB. Esse pode ser um dos motivos pelo qual a efetividade das vacinas no controle de CIB é questionável (O'CONNOR et al., 2011). Outras possíveis razões para a ineficiência das vacinais incluem: a variação genética e antigênica entre as cepas de *Moraxella bovis* e a presença de outros microrganismos envolvidos na enfermidade (BROWN et al., 1998). A proteção irregular conferida pelas vacinas frente à CIB motivou vários estudos sobre a biologia dos agentes etiológicos associados à doença, incluindo análises de proteínas de membrana externa (OMP, *outer membrane proteins*), lipopolissacarídeo (LPS), pili e citotoxina ou susceptibilidade a antibióticos (PRIETO et al., 1999; ANGELOS e BALL, 2007).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar a diversidade genética entre cepas de *Moraxella bovis* originárias de diferentes regiões geográficas (MARRS et al., 1985; PRIETO et al., 1999; CONCEIÇÃO, 2002; SOSA e ZUNIZO, 2013).

A variabilidade genética bacteriana pode ser confirmada pelo estudo dos fragmentos de DNA de tamanhos distintos, gerados a partir da amplificação de sequências repetidas existentes no genoma bacteriano, pelo uso de oligonucleotídeos específicos, por PCR (SAIKI et al., 1988).

A análise de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD), do inglês *random amplification of polymorphic*, é uma derivação do processo de PCR que envolve a amplificação do DNA genômico utilizando *primers* oligonucleotídeos únicos, curtos (10 nucleotídeos) e de sequência aleatória (LEAL, 2010). Esta técnica pode ser utilizada para o estudo de qualquer organismo, permitindo fazer

comparações sobre a diversidade genética e estrutura de populações entre organismos diferentes (TIBAYRENC, 1995). Essa ferramenta foi utilizada por Conceição (2002) com sucesso para detectar perfis moleculares de trinta isolados de *Moraxella bovis* recuperados de surtos de CIB ocorridos entre 1974 e 2001 na Argentina, Brasil e Uruguai, onde 48% das bactérias isoladas apresentaram perfis moleculares diferentes dos de cepas vacinais utilizadas na região, indicando uma possível pressão de seleção pelas vacinas ao longo do período estudado. A técnica de RAPD-PCR também foi empregada para verificar a existência de diversidade genética em plantas (RAFALSKY e TINGEY, 1993), parasitas (MURPHY e PELLECC, 1994), microrganismos (CHATELLIER et al., 1997; CAMPBELL et al., 2000) e animais (BOWLAND et al., 2001).

A técnica molecular do tipo ERIC (do inglês, *enterobacterial repetitive intergenic consensus*)-PCR também é empregada para identificar as variações genéticas existentes entre isolados de *Moraxella bovis*. Em estudos na Argentina, Prieto et al. (1999) estudaram a diversidade genética de 55 isolados de *Moraxella bovis* por meio de *primers* para ERIC-PCR. Estes autores observaram que a população estudada, formada por cinco grupos genéticos, era relativamente homogênea. Até agora as impressões digitais de RAPD-PCR e ERIC-PCR foram usadas para verificar a variabilidade genética entre estirpes de *Moraxella bovis* em estudos focados na epidemiologia da CIB (PRIETO et al., 1999; CONCEIÇÃO et al., 2004). Sosa e Zunino (2013) em um estudo com cepas de *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi*, utilizaram o DNA genômico dos diferentes isolados para as análises de RAPD-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, e o resultado deste trabalho confirmou a alta diversidade genética entre os isolados de *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi*, o que pode ser um problema sério para a formulação de vacinas efetivas contra a CIB.

2.2 Melhoramento genético de bovinos de corte

Os desafios impostos à bovinocultura de corte no Brasil exigem constantes buscas por aprimoramento de tecnologias visando melhorar os sistemas de produção e qualidade de produto final. Com todos esses desafios torna-se indispensável a obtenção e implementação de alternativas que permitam otimizar os índices zootécnicos dos rebanhos nacionais. Nesse contexto, o melhoramento

genético é uma ferramenta que visa o aumento e a melhoria da produtividade de um animal em determinado ambiente (FERRAZ e ELER, 2010).

Os programas de melhoramento de bovinos de corte têm focado em objetivos e critérios de seleção cada vez mais alinhados com a demanda da cadeia produtiva da carne, bem como dos consumidores. Objetivo de seleção entende-se pela estipulação de atributos de caráter econômico que se busca nos indivíduos (LOPES, 2011). Constituído o objetivo do programa de melhoramento genético animal, é necessário definir os critérios de seleção que são as características reprodutivas, produtivas ou morfológicas com base nas quais os animais são escolhidos (LOPES, 2011). Os critérios de seleção podem ser definidos por meio das informações sobre parâmetros genéticos (herdabilidade e correlações genéticas) e fenótipos (correlações fenotípicas) associados às características envolvidas no melhoramento.

O desempenho produtivo de um animal é influenciado por vários fatores ambientais (exemplo: nutrição, manejo, sanidade, etc.), pela composição do seu genótipo e pela interação entre estes dois fatores (CARDOSO, 2007). A genética é um dos importantes fatores para a maximização dos ganhos na produtividade. Com isso, torna-se indispensável a utilização de estratégias adequadas de seleção e acasalamento dos animais de acordo com os objetivos de cada rebanho.

O melhoramento genético tem como principal objetivo aumentar o desempenho de características produtivas e favoráveis a determinada população. Isso é possível por meio do aumento da frequência gênica desejável, ou ainda, redistribuição desses genes no rebanho. Seleção e sistemas de acasalamento são ferramentas utilizadas no melhoramento animal. Com elas é possível promover mudanças na constituição genética de uma população, e assim, fundamentar a escolha dos animais que produzirão filhos na próxima geração, ou seja, auxiliar na decisão de quais indivíduos poderão contribuir com a constituição genética da geração seguinte.

Em síntese, o objetivo dos programas de melhoramento genético é obter uma população com um genótipo superior, buscando avanços consideráveis na produção de animais cada vez mais eficientes e adaptados ao meio (BARON, 2000). Apesar de não apresentar ganhos expressivos momentâneos, o melhoramento genético permite ganhos constantes de geração em geração (CARDELLINO e ROVIRA, 1987), sem custos excessivos (CARDOSO, 2007).

O melhoramento genético animal no Brasil, até o início de década 80, era baseado na seleção de animais pela sua aparência (fenótipo). Após esse período, começaram a empregar as avaliações genéticas, por meio dos modelos mistos, com informações de fenótipo e pedigree (parentesco). Atualmente, as informações obtidas de dados genômicos vem sendo uma nova estratégia utilizada nos programas de melhoramento animal, com aplicação da seleção assistida por marcadores moleculares (ALENCAR, 2010).

2.2.1 Parâmetros genéticos

O conhecimento dos componentes de variância fenotípica, resultado da ação conjunta dos efeitos genéticos e de ambiente, é de grande importância para a escolha dos métodos de melhoramento e para a predição dos ganhos com seleção (ROSSMANN, 2001). Os efeitos ambientais mascaram o mérito genético dos indivíduos; assim, quanto maior a proporção da variabilidade decorrente dos efeitos ambientais em relação a variabilidade total, maior será o esforço para se selecionar genótipos superiores (BORÉM, 1998). A variância fenotípica pode ser conhecida a partir das estimativas de herdabilidade, dos coeficientes de correlação fenotípica, genotípica e ambiental, das variâncias genotípicas e fenotípicas entre outros parâmetros genéticos, que refletem a natureza do material genético e a ação do ambiente, permitindo assim, no auxílio da definição das estratégias de melhoramento que devem ser adotadas (ROSSMANN, 2001).

A herdabilidade é de fundamental importância para a estimação dos ganhos genéticos e para a escolha dos métodos de seleção a serem aplicados (REIS, 2000), uma vez que é capaz de separar as diferenças genéticas das não genéticas (ambientais) entre indivíduos. Rodrigues (2006) e Kizilkaya et al (2013) encontraram estimativa de herdabilidade para susceptibilidade à CIB em animais da raça Angus de 0,06 a 0,10. Snowden et al. (2005), em trabalhos anteriores estimaram a herdabilidade da característica para a raça Hereford em 0,28.

2.2.2 Marcadores moleculares no melhoramento genético animal

Os marcadores moleculares são polimorfismos de nucleotídeos ou de sequências de nucleotídeos com posição conhecida no genoma. A partir desses marcadores é possível detectar e localizar genes (regiões do genoma) também polimórficos que afetam a expressão de características de interesse econômico.

A utilização dos marcadores genéticos em programas de melhoramento animal iniciou na década de 90 (SOUZA, 2013) e surgiu como uma ferramenta para auxiliar os melhoristas na seleção de genótipos superiores (MORO, 2010). Segundo Nascimento (2010), os resultados obtidos com a genética molecular auxiliam para que um programa de melhoramento seja eficaz e preciso.

Com o advento do sequenciamento do genoma bovino (ELSIK, et al., 2009), inúmeros polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) foram descobertos. Os marcadores genéticos do tipo SNP se baseiam nas alterações mais elementares da molécula de DNA, isto é, modificações em apenas uma das bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e/ ou Guanina) na sequência genética de um indivíduo em comparação com um genoma referência (SOUZA, 2013). Em virtude disso, atualmente estão disponíveis comercialmente algumas opções para genotipagem de bovinos com painéis de SNP, são exemplos: Illumina BovineSNP50 (MATUKUMALLI et al., 2009) BovineHD (ILLUMINA, 2011), Bovine3K (ILLUMINA, 2011) e a Affymetrix BOS 1 (AFFYMETRIX, 2011).

2.3 Estudos de associações ampla do genoma (GWAS)

As informações fornecidas pelos marcadores moleculares podem ser utilizadas no processo de identificação de regiões do genoma relacionadas com a expressão das características de interesse, através de um estudo de associação ampla do genoma (GWAS) (HAYES e GODDARD, 2010; HAYES et al., 2013). Os caracteres quantitativos de interesse zootécnico são, em sua maioria, resultantes da ação conjunta de vários genes, o que implica em forte influência ambiental na expressão fenotípica.

Análises envolvendo marcadores moleculares possibilitaram grande avanço no estudo de características quantitativas, principalmente na elaboração de mapas genéticos. Esta abordagem ficou conhecida como mapeamento de QTLs. A denominação QTL (*Quantitative Trait Loci*) é utilizada para nomear as regiões cromossômicas que contêm genes (ou locos) que controlam esses caracteres quantitativos (FALCONER e MACKAY, 1996), importantes para espécies animais, permitindo a utilização de valores genômicos (PAUSCH et al., 2012).

Com isso, os estudos de associação genômica ampla (GWAS) utilizam uma grande quantidade de marcadores do tipo SNP espalhados por todo o genoma para identificar possíveis associações entre regiões cromossômicas e os fenótipos de

interesse, e supõem que uma determinada mutação relacionada à expressão da característica esteja fortemente ligada (em desequilíbrio de ligação) com alguns marcadores (MENEZES et al., 2013). O LD (*Linkage Disequilibrium* - LD) é uma medida estatística da associação entre alelos de diferentes locos, ou seja, esta medida descreve a associação não aleatória entre dois ou mais locos no mesmo cromossomo (ARDLIE et al., 2002).

3 Objetivos

Objetivo geral

Caracterizar fenotípica e genotipicamente animais da raça Hereford durante surtos de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB).

Objetivos específicos

- Acompanhar surtos de CIB em animais da raça Hereford, para identificar animais que adoeceram e a evolução da doença nos mesmos, por meio de atribuição de escores às lesões;
- Isolar bactérias do gênero *Moraxella* spp. para a determinação do agente etiológico;
- Caracterizar a diversidade genética das cepas de *Moraxella* spp. isoladas dos surtos ;
- Estimar a correlação entre pigmentação ocular e susceptibilidade à CIB;
- Estimar a herdabilidade da susceptibilidade para CIB utilizando métodos de genética quantitativa (modelo limiar);
- Fazer estudo de associação genética ampla de marcadores genéticos com a susceptibilidade à CIB.

4 Capítulo 1 – Comparação entre diferentes técnicas de identificação bacteriológica de cepas de *Moraxella* spp. envolvidas em casos clínicos de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina em bovinos da raça Hereford

4.1 Introdução

A Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB) é uma das principais doenças oculares que afetam os bovinos no mundo. Trata-se de uma doença estacional, com distribuição mundial e com prevalência elevada em algumas raças, dentre as quais pode-se destacar a raça Hereford (GIL TURNES, 2001). Em propriedades onde a CIB é endêmica, as taxas de incidência são maiores nos animais jovens (KILLINGER, 1977). No Rio Grande do Sul, os surtos de CIB apresentam taxas mais altas no fim do verão e início de outono, coincidindo com o aumento da população de moscas que transmitem a bactéria a animais suscetíveis (GERHARD et al., 1982).

O agente etiológico causador da CIB é *Moraxella bovis*, embora haja evidências circunstanciais da participação de *Moraxella ovis* e *Moraxella bovoculi* na patogenia da CIB. A participação destas outras espécies na etiologia da doença ainda não foi confirmada (GOULD et al., 2013) pois, até o presente momento, não foram documentadas tentativas bem-sucedidas de cumprir os postulados de Koch com estas espécies. Com isso seus papéis na fisiopatologia do CIB permanecem obscuros (MAIA, 2015).

O diagnóstico definitivo para CIB é realizado pelo isolamento e identificação do agente bacteriano a partir de secreções colhidas adequadamente do olho e/ou cavidade nasal, conhecido normalmente como exame bacteriológico ou cultura (MARTINEZ e TADEI, 2005). Os métodos clássicos de identificação bacteriológica incluem a caracterização morfológica da bactéria e de suas colônias, coloração de Gram, condições de crescimento em meios seletivos, potencial para assimilação de certos açúcares, reações bioquímicas específicas, susceptibilidade a antibióticos, entre outras (SUTTON e CUNDELL, 2004).

Embora a caracterização morfológica e bioquímica não sejam suficientes para identificar espécies bacterianas de forma segura (CARBONNELLE et al., 2011), esta caracterização é muito útil para que sejam verificadas as características fisiológicas das bactérias isoladas. Uma alternativa para um diagnóstico confiável se dá pela identificação da espécie de *Moraxella* spp. por testes moleculares (MAIA, 2015), por

meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida pela clivagem por enzimas de restrição (reconhecem e atuam sobre sequências específicas de DNA) (ANGELOS e BALL, 2007), ou, definitivamente, pelo sequenciamento da região intergênica 16S-23S (ANGELOS et al., 2007a).

Além dos testes bioquímicos e moleculares, um novo método de identificação está sendo empregado para auxiliar no diagnóstico laboratorial de CIB, a metodologia MALDI-TOF (Espectrometria de massa associada com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voo), que vem sendo amplamente utilizado para a identificação de microrganismos (STEVENSON, et al. 2010). A principal característica desta técnica está na capacidade de gerar um espectro baseado na massa e na carga dos componentes proteicos de uma determinada amostra (ANGELETTI, 2017).

Embora a mortalidade por CIB não seja elevada, o diagnóstico rápido e preciso é necessário, visto que a doença pode afetar até 80% do rebanho (POSTMA et al., 2008). Esta doença é caracterizada por alta morbidade (POSTMA et al., 2008), sendo consideráveis os prejuízos econômicos por ela causados (SLATTER et al., 1982; KIRKPATRICK e LALMAR, 2015).

O presente estudo teve como objetivo comparar diferentes técnicas de identificação bacteriológica dos agentes envolvidos na CIB, são elas: 1) análises morfológicas e testes bioquímicos, 2) MALDI-TOF, 3) PCR e 4) sequenciamento, para assim poder avaliar a acurácia das análises morfológicas, testes bioquímicos, MALDI-TOF e PCR em comparação ao sequenciamento da região intergênica 16S-23S para a identificação de *Moraxella* spp.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta das amostras

Logo no início dos surtos de CIB, nos anos de 2015 a 2017, amostras de secreções oculares e nasais foram coletadas de bovinos Hereford acometidos por CIB, para possibilitar a identificação do agente bacteriológico causador da enfermidade. Os animais são provenientes de oito fazendas, localizadas no sul do estado do Rio Grande do Sul.

A coleta do material biológico de 90 animais foi realizada com o auxílio de um suabe esterilizado que, imediatamente após ser esfregado de forma individual na fenda palpebral do olho direito (OD) e olho esquerdo (OE), narina direita (ND) e

narina esquerda (NE) foi inoculado sobre placas com meio ágar sangue (meio BHI, do inglês, *Brain Heart Infusion Agar*, com 5% de sangue desfibrinado de carneiro), totalizando 360 amostras coletadas. Após a coleta do material biológico as placas foram encaminhadas para o Laboratório de doenças Infecciosas da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) para diagnóstico bacteriológico.

A identificação bacteriológica foi realizada por meio de três diferentes técnicas: análises morfotintorial e testes bioquímicos (MACFADDIN, 2000), MALDI-TOF e reação em cadeia da polimerase (PCR). Para fim de comprovação molecular e verificação da acurácia dos resultados a técnica de sequenciamento de DNA dos isolados de *Moraxella* spp foi empregada.

4.2.2 Identificação bacteriológica por meio de análises morfotintorial e testes bioquímicos

As placas semeadas no campo foram incubadas a 37° C por 24 horas. Após o crescimento de microrganismos, colônias com características de *Moraxella* spp., ou seja, pequenas, esbranquiçadas e β -hemolíticas, foram ressemeadas em meio ágar sangue para que fossem isoladas (37°C durante 24 horas). Embora possa haver *Moraxella* spp. não hemolítica, o isolamento foi focado apenas nas colônias β -hemolíticas, pois apenas estas são patogênicas (BROWN et al., 1998). Com as colônias puras, com características compatíveis com as de *Moraxella* spp., foram confeccionados esfregaços em lâminas. Estes foram corados pelo método de Gram, conforme recomendação do fabricante (Conjunto para coloração de Gram - NewProv®), e visualizados no microscópio óptico, com 1000 vezes de magnificação.

Confirmando-se a presença de bacilos, cocos, cocobacilos ou diplococos Gram-negativos, a caracterização bacteriológica clássica foi continuada pela realização de testes bioquímicos (hemólise, oxidase, catalase, redução de nitratos e liquefação da gelatina), como apresentado na Tabela 2, de acordo GOMES (2012) e ANGELOS et al. (2007a), com algumas adaptações.

Tabela 2: Características diferenciais entre espécies de *Moraxella* spp.

Análise Laboratorial	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovoculi</i>	<i>M. ovis</i>
Morfologia	CB - B	DC	C
Hemólise	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Catalase	(+ / -)	+	+
Redução de nitratos	-	+	+
Liquefação da gelatina	+	-	-

CB = Cocobacilos; B= Bacilos; DC = Diplococos; C = Cocos; (-) = Reação negativa; (+) = reação positiva; (+/-) = Variável.

Fonte: adaptado GOMES, 2012 e ANGELOS et al., 2007a.

4.2.3 Identificação bacteriológica por meio da técnica MALDI-TOF

Como forma de incrementar o método tradicional microbiológico para detectar os agentes etiológicos da CIB, introduziu-se a técnica de MALDI-TOF. As amostras foram preparadas a partir de colônias puras, que foram suspensas em água ultra pura, para a lavagem. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (17.000g), por dois minutos para eliminação do sobrenadante. As colônias foram ressuspensas em água ultra pura (200 µL) e logo após foram inativadas com 700 µL de etanol absoluto. Amostras preparadas conforme descrito acima foram encaminhadas para a Embrapa Gado de Corte (Campo Grande - MS) para identificação bacteriológica por meio da técnica de MALDI-TOF. As amostras foram preparadas com base no protocolo de extração com etanol/ácido fórmico, descrito por Sauer et al. (2008) e revisto por Freiwald e Sauer (2009).

As amostras foram centrifugadas (16.000g) por dois minutos, o sobrenadante foi descartado por meio da inversão do tubo. Após secagem do pellet em temperatura ambiente, as proteínas celulares foram extraídas adicionando-se ao sedimento uma solução de 70% de ácido fórmico. Após homegeinização do conteúdo, foi adicionado o mesmo volume de acetonitrila pura. Após uma nova centrifugação (16.000g/ 2 min.) aplicou-se 1 µL do sobrenadante em poço da placa de MALDI, deixando-se secar em temperatura ambiente. Cada amostra foi coberta por 1 µL de ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico, na concentração de 5mg/mL em solução contendo 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoracético. Após secar, a mistura cristalizada foi analisada utilizando-se o espectrômetro de massa Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics).

A obtenção e análise dos espectros de massa das amostras foi realizada conforme descrito por Bier et al. (2017). Dez espectros, a partir de diferentes posições da amostra, foram somados após a calibração externa com uma mistura de calibração padrão para bactérias (Bruker Daltonics). Os espectros brutos foram processados usando o programa MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) com as configurações padrões para a obtenção da identificação bacteriana. O MALDI Biotyper confronta os espectros de cada amostra desconhecida diretamente com a biblioteca de referência integrada (IVD, *In Vitro Diagnostic System* - Bruker Daltonics).

As análises pelo Biotyper são classificadas por meio de escores propostos pelo fabricante: valores entre 2,300 e 3,000 indica a identificação confiável de espécie; valores entre 2,000 e 2,299 indicam a identificação confiável de gênero e provável identificação de espécie, valores entre 1,700 e 1,999 indicam provável identificação de gênero e uma pontuação abaixo de 1,700 indica que a identificação não é confiável.

4.2.4 Identificação bacteriológica por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todos os isolados bacterianos previamente caracterizados como *Moraxella* spp. por meio de testes bioquímicos, foram utilizados para identificação bacteriológica por PCR, a fim de se confrontar os resultados entre as diferentes técnicas.

4.2.4.1 Extração de DNA

O protocolo para extração de DNA genômico utilizado neste estudo foi adaptado a partir do protocolo desenvolvido por Ausubel et al. (2003), destinado a bactérias, com algumas modificações, a saber: inicialmente, as amostras foram suspensas em solução de TE [Tris-HCl (trisma base-ácido clorídrico) 1M - pH 8/ EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-Acético) 0,5 M] e, após, centrifugadas a 17.000g por 2 minutos. Em seguida, fez-se a ressuspensão celular em 567µL de solução TE com RNase (0,04mg/mL), misturando-se por pipetagem. Após essa etapa, adicionou-se 3µL de SDS 10% e 3µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubou-se por 1 hora em banho-maria a 37°C. Após incubação adicionou-se 100µL de NaCl 5M e 80µL de CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) 10% em NaCl (cloreto de sódio)

0,7M; homogeneizou-se rapidamente por vortéx, incubando-se novamente em banho-maria por mais 10 minutos a 65°C. Em seguida, adicionou-se 400µL de fenol e 400µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturou-se vigorosamente por vortéx por um minuto, em seguida centrifugou-se por 5 minutos a uma velocidade de 17.000g; transferiu-se 500 µL da fase aquosa (superior) para outro tubo e realizou-se uma nova extração com 800µL clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Da fase aquosa (superior) foram retirados 500 µL e passados para um tubo novo. Os ácidos nucléicos foram precipitados com um volume de isopropanol gelado (100% do volume da amostra, ou seja, 500 µL). Deixou-se *overnight* a uma temperatura de -20°C. No dia seguinte, centrifugou-se a 17.000g durante 10 min. e o precipitado de ácidos nucléicos foi lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e dissolvido em 100µL de TE.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop 2000, com o objetivo de detectar a quantidade de DNA nas concentrações amostrais (ng/µL). A leitura da absorbância, de 2 µL de amostra foi realizada em dois comprimentos de onda, 260 e 280 nm. A qualidade do material (DNA) foi estimada pelo valor DNA nas concentrações amostrais > 30ng/µL e pela razão DO_{260nm}/DO_{280nm} , que deve ser superior a 1,7 (REGITANO 2001, LEE et al. 2010). As amostras foram mantidas a -20°C até a realização da PCR.

4.2.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da região intergênica 16S-23S, com fragmentos de 650pb para *Moraxella bovis* e 600pb para *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*, foi sintetizado com base na sequência: ISRdown (5'-GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3') e ISRup (5'ACCGACGCTTATCGCAGGCTATCA-3') (Angelos e Ball 2007).

A quantidade de reagentes utilizada para a amplificação individual de DNA e as condições de amplificação para as amostras do gênero *Moraxella* estão descritos nas tabelas 3 e 4, respectivamente (Angelos e Ball 2007).

Tabela 3: Reagentes utilizados para a amplificação individual de DNA de amostras do gênero *Moraxella*.

Reagentes (concentração inicial)	Concentração Final	Volume
Água ultra pura	-	q.s.p
Tampão de PCR (5X)	1 X	5µL
MgCl ₂ - (25mM)	1,50 mM	1,5µL
Mix de dNTP - (10mM)	0,20 mM	0,50µL
Primer - ISRdown - (10nmol)	10,00 (µmol/µL)	1µL
Primer - ISRup - (10nmol)	10,00 (µmol/µL)	1µL
Taq DNA Polimerase - (5U/µL)	1 U	0,20µL
Amostra de DNA (25 ng/ µL)	100 ng	4µL
Volume Final	-	25µL

q.s.p= quantidade suficiente para.

Tabela 4: Condições de amplificação para as amostras do gênero *Moraxella*.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	1 min.	1 Ciclo
95°C	30 seg.	35 Ciclos
55°C	30 seg.	
72°C	40 seg.	
72°C	4 min.	1 Ciclo

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática pela enzima de restrição *RsaI*, a fim de se diferenciar as espécies de *Moraxella* envolvidas no surto de CIB (Figura 1). Segundo Angelos & Ball (2007b) a *RsaI* cliva somente o DNA amplificado de *Moraxella bovoculi* (600pb) em um único sítio de restrição, o que resulta em dois fragmentos de aproximadamente 150 e 450pb. A enzima *RsaI* não cliva o fragmento de *Moraxella bovis* (650pb) nem de *Moraxella ovis* (600pb) (ANGELOS & BALL, 2007b). Cerca de 10µL de cada reação de PCR foram misturados a 0,5 µL da enzima *RsaI*, 7,3µL de água ultra-pura, 2µL de tampão (Restriction Enzyme 10X Buffer) e 0,2µL de soroalbumina bovina acetilada (*Acetylated BSA*, do inglês, *bovine serum albumin*), e então incubados em banho-maria (37° C) por 4 horas. Os produtos de digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8%, em tampão de TBE 1X, em voltagem constante de 110V por 4 horas, utilizando um padrão molecular de 100pb DNA Ladder (Ludwig Biotec®). Em seguida, foram corados por submersão em solução de GelRed™, agitado suavemente por 30 minutos, visualizados em transiluminador UV

(UVITEC Imaging Systems) e as imagens digitais foram capturadas pelo sistema do próprio aparelho para posterior análise.

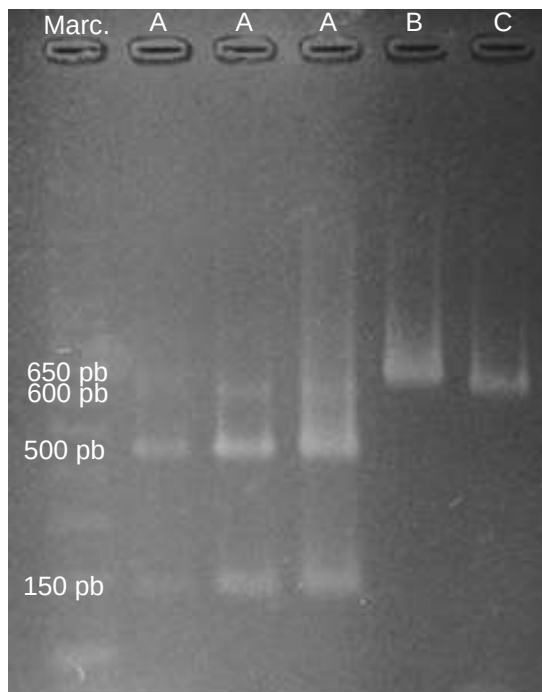


Figura 1: Eletroforese em agarose 1, 8%, produto da reação de PCR digerido com RsaI. Marc.= marcador de 100 pb; A = *Moraxella bovoculi* (clivado uma vez em fragmentos de ~450pb e ~150 pb); B= *Moraxella bovis* (~650 pb); C= *Moraxella ovis* (~600 pb).

4.2.5 Sequenciamento de DNA dos isolados de *Moraxella* spp.

As amostras que apresentaram resultados divergentes entre as três técnicas desenvolvidas acima foram encaminhadas para sequenciamento da região intergênica 16S-23S. A técnica de sequenciamento do tipo Sanger foi realizada pela empresa especializada Helixxa, contratada especificamente para este serviço.

Após realizar as reações de PCR (explicado no item 5.2.4) das amostras selecionadas para o sequenciamento, estas foram submetidas à purificação pelo *kit* MinElute® – PCR Purification Kit (*Qiagen*®) conforme recomendado pelo fabricante. Para o sequenciamento do tipo Sanger, as reações de foram realizadas com *kit* BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing, seguindo as condições estabelecidas pelo fabricante. Após a reação, os fragmentos gerados foram submetidos a eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*®).

Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento da região intergênica 16S-23S rRNA foram conferidos no software DNA Baser (v4.36.0) no

qual foram geradas as sequências consenso para cada amostra. Essas sequências foram confrontadas com o banco de dados contido no GenBank com a ferramenta BLAST otimizado para sequências altamente similares (MegaBLAST).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por meio de análise morfológica e testes bioquímicos

Todos os 90 animais dos quais foram coletadas amostras apresentavam sintomas clínicos característicos de CIB. Porém, o diagnóstico bacteriológico possui algumas limitações que podem estar associadas ao baixo número de *Moraxella* spp. presente nas secreções oculares e nasais dos bovinos no momento da coleta ou ainda à dificuldades em relação ao isolamento dos agentes presentes na amostra devido ao alto grau de contaminação destas durante a colheita do material (FRÁGUAS et al., 2008), o que explica o fato de se ter isolado apenas 55 cepas de *Moraxella* spp. de um total de 360 amostras.

Todos os 55 isolados que formaram colônias circulares, lisas e esbranquiçadas, com 1 a 3 mm de diâmetro, apresentando um estreito halo de β -hemólise (Figura 2) foram tratados como prováveis cepas de *Moraxella* spp.



Figura 2: Características macroscópicas típica de *Moraxella* spp: colônias circulares, lisas, esbranquiçadas, pequenas e hemolíticas.

A caracterização microscópica das colônias isoladas indicou que as mesmas pertencem ao grupo das bactérias Gram-negativas. Bactérias com morfologia de cocobacilos (Figura 3A) e diplococos (Figura 3B) foram observadas.

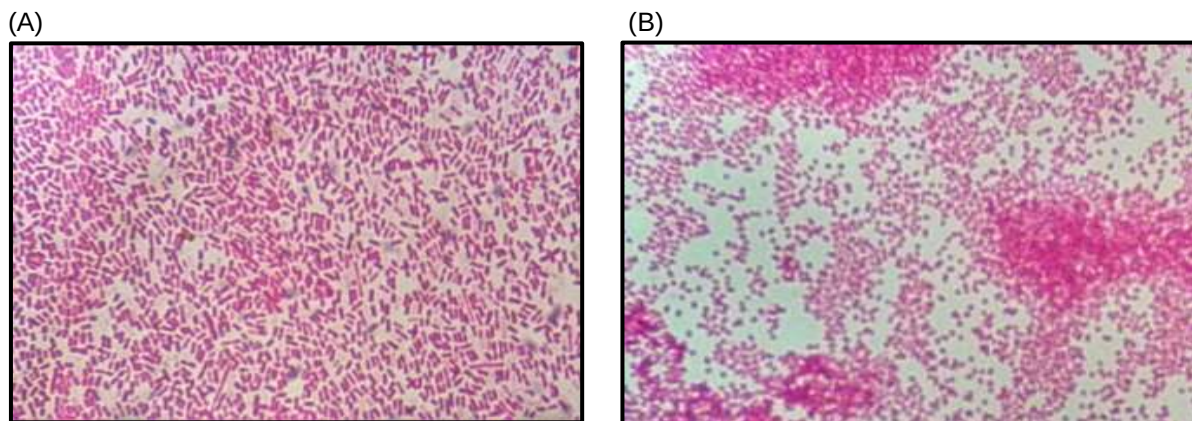


Figura 3: Cocobacilos gram negativos - A; Diplococos gram negativos – B.

Após a etapa de pré-seleção, todos os 55 isolados apresentaram as características macroscópicas e microscópicas descritas para *Moraxella* spp. (Anexo A). De acordo com Conceição e Gil Turnes (2003), *Moraxella bovis* apresenta pleomorfismo variado, exibindo-se aos pares ou em cadeias curtas de cocos, cocobacilos e bacilos. Já *Moraxella bovoculi* exibe-se como cocos, que geralmente ocorrem aos pares (diplococo) (ANGELOS et al, 2007a).

Por último, de acordo com a ampla bateria bioquímica realizada (Anexo I), observou-se que todos os isolados foram positivos para a produção de oxidase. No que diz respeito à catalase, observou-se que a expressão desta enzima é variável, bem como a produção de gelatinase, sendo que apenas dois isolados foram capazes de degradar a gelatina, característica que é esperada apenas para bactérias da espécie *Moraxella bovis* (Tabela 2 – página 36).

A espécie *Moraxella bovis*, de acordo com os testes bioquímicos, pode ser caracterizada como positiva para oxidase e variável para catalase, não reduz nitratos e é capaz de degradar a gelatina (BROWN et al., 1998).

A *Moraxella bovoculi* pode ser diferenciada da *Moraxella bovis* e *ovis* pelo teste liquefação da gelatina, sendo *Moraxella bovoculi* negativa e *Moraxella bovis* e *ovis* positivas para esta reação.

Com isso, dos 55 isolados de *Moraxella* spp., apenas três (5,45%) deles apresentaram caracterização bioquímica esperadas para a espécie *Moraxella bovis*, uma (1,82%) para espécie *Moraxella ovis*, o restante, *Moraxella bovoculi* (92,73%) (Figura 4A).

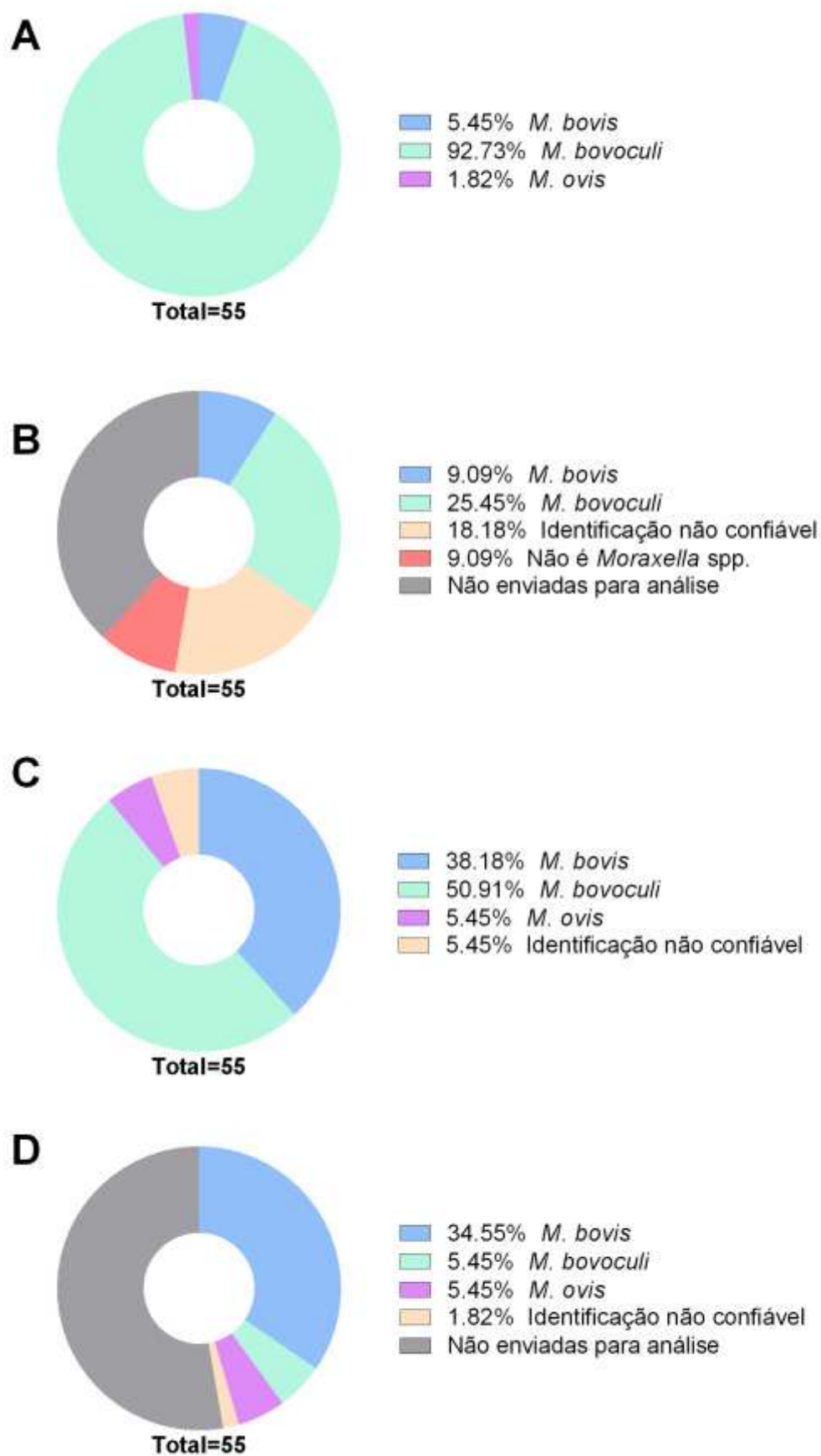


Figura 4: Distribuição dos resultados de identificação dos isolados de *Moraxella* spp. por meio das quatro diferentes técnicas: A) Análise morfo-tintorial e bioquímico; B) MALDI-TOF; C) PCR; D) Sequenciamento.

Embora apenas a caracterização bioquímica não seja uma forma segura para identificar espécies bacterianas (CARBONNELLE et al., 2011), esta técnica é muito útil para verificação das características fisiológicas das bactérias isoladas, permitindo a obtenção de melhores resultados por meio de outras técnicas mais precisas. Além disso, neste estudo, a caracterização morfológica e bioquímica foi importante na diferenciação do gênero *Moraxella* de outros gêneros.

4.3.2 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por MALDI-TOF

Dos 55 isolados previamente caracterizados como sendo do gênero *Moraxella* spp. por meio de análises morfológicas e testes bioquímicos, foram recuperadas 34 amostras, para serem caracterizadas por meio da técnica de MALDI-TOF, para que os resultados fossem confrontados com o método tradicional de identificação microbiana.

A técnica de MALDI-TOF tem sido utilizada com sucesso para a identificação de uma grande variedade de espécies bacterianas (CONWAY et al. 2001; VERBISCK et al., 2013; SCHULTHESS et al. 2016). Esta é baseada na reprodutibilidade do espectro de massas que, quando gerado, fornece um perfil proteômico do microrganismo desconhecido. Esse perfil é único para cada espécie de microrganismo. Cada perfil é automaticamente comparado a uma biblioteca de espectros de referência, gerando um *ranking* numérico com a lista dos microrganismos mais estreitamente relacionado. Esse *ranking* indica o nível de confiança na identificação e, dependendo de quão elevado é o valor, o organismo é identificado no nível de gênero ou espécie (PATEL, 2013).

Das 34 amostras caracterizadas por MALDI-TOF, cinco foram identificados como *Moraxella bovis* (14,70%), 14 como *Moraxella bovoculi* (41,18%), 10 amostras apresentaram identificação não confiável (29,41%) e cinco amostras foram apontadas pela técnica de MALDI-TOF como não pertencentes ao gênero bacteriano das *Moraxella* (Figura 4B).

Identificação não confiável na técnica de MALDI-TOF significa que o escore obtido pela amostra foi menor do que o necessário para afirmar com certeza que se trata de um determinado gênero ou espécie de microrganismo. Pode se dar pela falha na preparação da amostra ou ainda pelo fato de não ter havido nenhum espectro de referência presente no banco de dados semelhante o suficiente para fornecer um escore maior que 1,700, de acordo com os parâmetros da análise feita

pelo software Biotyper do aparelho de MALDI-TOF. Uma alternativa para se resolver essa questão é aumentar a inclusão de cepas de *Moraxella* spp. “referência” à biblioteca de referência integrada (IVD, *In Vitro Diagnostic System* - Bruker Daltonics) para a realização da técnica por MALDI-TOF, o que aumentaria a confiabilidade dos resultados.

Uma das vantagens da técnica MALDI-TOF é a identificação bacteriana por meio do seu perfil proteico ao invés de diferenciações físicas, metabólicas ou bioquímicas. Graças a isso, a técnica vem sendo cada vez mais empregada no diagnóstico microbiológico, tendo até substituído os métodos bioquímicos convencionais em alguns laboratórios no mundo (PASTERNAK, 2012). Ao longo dos últimos anos a técnica de MALDI-TOF vem sendo empregada em estudos que avaliam essencialmente sua capacidade de identificar (> 99%) as bactérias gram negativas e positivas (SPANU et al., 2011; BARNINI et al., 2015; RIEDERER et al., 2015). Porém, estudos de proteomas podem ser inconclusivos, uma vez que o perfil proteico bacteriano pode mudar ou ser inconstante de acordo com o seu tempo de vida e condições ambientais (ROCHA et al., 2005).

4.3.3 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Como houve divergências importantes entre a identificação das bactérias pelo método morfotintorial/bioquímico em confronto com o MALDI-TOF, optou-se por também realizar a identificação por PCR da região intergênica 16S-23S de todas as amostras. Esta técnica foi escolhida por ser eficiente na identificação de espécies do gênero *Moraxella* spp. (ANGELOS e BALL, 2007).

Dos 55 isolados de *Moraxella* spp., 21 foram identificados como *Moraxella bovis* (38,18%), 28 como *Moraxella bovoculi* (50,91%), três como *Moraxella ovis* (5,45%) e ainda duas amostras apresentaram identificação não confiável (3,63%) (Figura 4C).

A técnica de PCR realizada nesse estudo mostrou-se eficaz na determinação dos agentes microbiológicos. Em estudo semelhante, utilizando amostras das secreções oculares de bovinos e ovinos com ceratoconjuntivite infecciosa (CI) provenientes de 18 municípios do estado do Rio Grande do Sul, Libardoni et al. (2012) obtiveram sucesso na identificação das bactérias *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* por meio da técnica de PCR.

Estudos vêm demonstrando a possibilidade do uso da técnica de PCR no diagnóstico de doenças em bovinos, permitindo maior acurácia no diagnóstico em relação aos métodos tradicionais de identificação bacteriológica (ANGELOS et al., 2007b; LANGE et al., 2011; PEREIRA e PETRECHEN, 2011; LIBARDONI et al., 2012; FILHO et al., 2014; CAITANO et al., 2014). Contudo, a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase apresenta as desvantagens do alto custo devido à necessidade de infraestrutura, equipamentos e reagentes específicos para desenvolvimento da técnica (BATINGA, 2017).

4.3.4 Identificação das bactérias envolvidas na CIB por sequenciamento de DNA dos isolados de *Moraxella* spp.

A maioria das 26 divergências encontradas entre as três técnicas (análise morfológica/bioquímica, MALDI-TOF e PCR) foram solucionadas por meio do sequenciamento de DNA dos isolados de *Moraxella* spp. (Anexo A), pelo fato de que a técnica é mais confiável (NOLTE e CALIENDO 2003), porém mais onerosa. Dos 26 isolados de *Moraxella* spp. submetidos a avaliação de sequenciamento, 19 eram *Moraxella bovis* (73,07%), três *Moraxella bovoculi* (11,53%), três como potencial *Moraxella ovis*¹ (11,53%) e ainda uma amostra apresentou resultado não conclusivo (3,84%) (Figura 4 - D).

Todas as amostras foram confrontadas com o banco de dados contidos no GenBank, no qual as amostras que apresentaram identidade (número que indica a quantidade de nucleotídeos alinhados, em %) e cobertura (porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento presente no banco de dados, em %) maiores que 99%, eram aceitas como da espécie proposta (TIMBÓ, et al., 2017). Porém no caso das três amostras de *Moraxella ovis* quando confrontada com os dados do GenBank apresentaram cobertura do genoma de 100% e identidade de 92%, com isso classificamos como uma potencial *Moraxella ovis*¹. Entretanto, estudos adicionais serão desenvolvidos com estas três amostras.

4.3.5. Comparação entre as técnicas de identificação dos isolados de *Moraxella* spp.

• Análise morfológica/bioquímica x MALDI-TOF

Os resultados da identificação bacteriológica pelo método tradicional e MALDI-TOF das 34 amostras estudadas estão apresentadas na Tabela 5. Dos 34

isolados, 14 foram identificados como *Moraxella bovoculi* em ambas as técnicas, enquanto outros nove isolados identificados como *Moraxella bovoculi* por meio de análises morfo-tintorial e testes bioquímicos, apresentaram identificação não confiável quando exposta à técnica de MALDI-TOF, outros três isolados de *Moraxella bovoculi* foram identificados por MALDI-TOF como *Moraxella bovis*, e ainda, cinco isolado foram classificados como não pertencente a gênero bacteriano das *Moraxella*.

Dos três isolados identificados como *Moraxella bovis* pelo método tradicional (série bioquímica), dois foram confirmados pela técnica de MALDI-TOF o outro apresentou identificação não confiável para o gênero bacteriano das *Moraxella* (Tabela 5).

Tabela 5: Identificação dos agentes envolvidos na CIB por análise tradicional e por MALDI-TOLF.

Nº de amostras	Série Bioquímica	MALDI-TOF
14	<i>M. bovoculi</i>	<i>M. bovoculi</i>
9	<i>M. bovoculi</i>	Identificação não confiável
5	<i>M. bovoculi</i>	Não é <i>Moraxella</i>
3	<i>M. bovoculi</i>	<i>M. bovis</i>
2	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
1	<i>M. bovis</i>	Identificação não confiável
Total = 34	-	-

Dos 34 isolados de *Moraxella* spp., 16 (47,05%) apresentaram resultado em comum entre as duas técnicas propostas (Tabela 6). Logo, 18 (52,94%) dos isolados de *Moraxella* spp. apresentaram resultados divergentes entre as distintas técnicas.

Tabela 6: Comparação entre a identificação obtida de acordo com as distintas técnicas: análise morfo-tintorial e bioquímica, MALDI-TOF, PCR e sequenciamento.

	Séries Bioquímicas	MALDI-TOF	PCR	Sequenciamento
Séries Bioquímicas	100%	47,05%	50,90%	7,70%
MALDI-TOF	34	100%	58,82%	11,53%
PCR	55	34	100%	96,15%
Sequenciamento	26	26	26	100%

Diagonal superior: porcentagem de similaridade entre as amostras; Diagonal inferior: Número de amostras avaliadas por ambas as técnicas.

A identificação bacteriológica por meio da técnica de MALDI-TOF frente aos testes de diferenciação físicas, metabólicas ou bioquímicas apresentam grandes vantagens.

¹ Identificação não confiável.

Estudos realizados por Cherkaoui et al. (2010), analisando 720 amostras clínicas, comparando os dois métodos: MALDI-TOF com a identificação convencional bacteriana, os autores concluíram que, se MALDI-TOF tivesse sido aplicado como teste inicial o tempo para conclusão dos resultados teria sido reduzido para aproximadamente 8 horas.

De acordo com Bier (2016), a metodologia de MALDI-TOF permitiu a rápida confirmação da identidade de *Salmonella* spp. e *E. coli* em carcaças de bovinos durante o processamento em abatedouros-frigoríficos, representando um avanço na precisão de identificação de microrganismos patogênicos. Barreiro (2010) afirma que a técnica de MALDI-TOF pode acelerar a identificação de patógenos causadores da mastite subclínica bovina.

● Análise morfológica/bioquímica x PCR

Dos 55 isolados de *Moraxella* spp., apenas 28 (50,90%) apresentaram resultado em comum entre as técnicas (Tabela 6), sendo apenas duas *Moraxella bovis* e 26 *Moraxella bovoculi* (Figura 5). Logo, 27 (49,09%) dos isolados de *Moraxella* spp. apresentaram resultados divergentes entre as distintas técnicas.

Dentre os 55 isolados (Figura 5), 51 amostras previamente identificadas como *Moraxella bovoculi* por meio de provas bioquímicas na PCR foram identificadas como sendo: 19 *Moraxella bovis*, 26 *Moraxella bovoculi*, três *Moraxella ovis* e ainda três amostras não apresentaram resultado conclusivo (PCR falhou ou ainda o tamanho da banda não foi característico com o da espécie estudada). Entre as cepas identificadas previamente pelo método convencional como *Moraxella bovis*, foram identificadas por PCR como sendo: duas *Moraxella bovis* e uma *Moraxella bovoculi*. E ainda, a única *Moraxella ovis* que foi isolada no surto de CIB em questão, identificada por série bioquímica, na verdade foi identificada como possível *Moraxella bovoculi* por PCR.

As técnicas moleculares trazem vantagens na identificação de patógenos relacionados às doenças que acometem bovinos de corte e leite (SILVA, 2015; REZENDE, 2016), pois são técnicas de alta especificidade quando comparadas com as metodologias convencionais de identificação microbiológica.

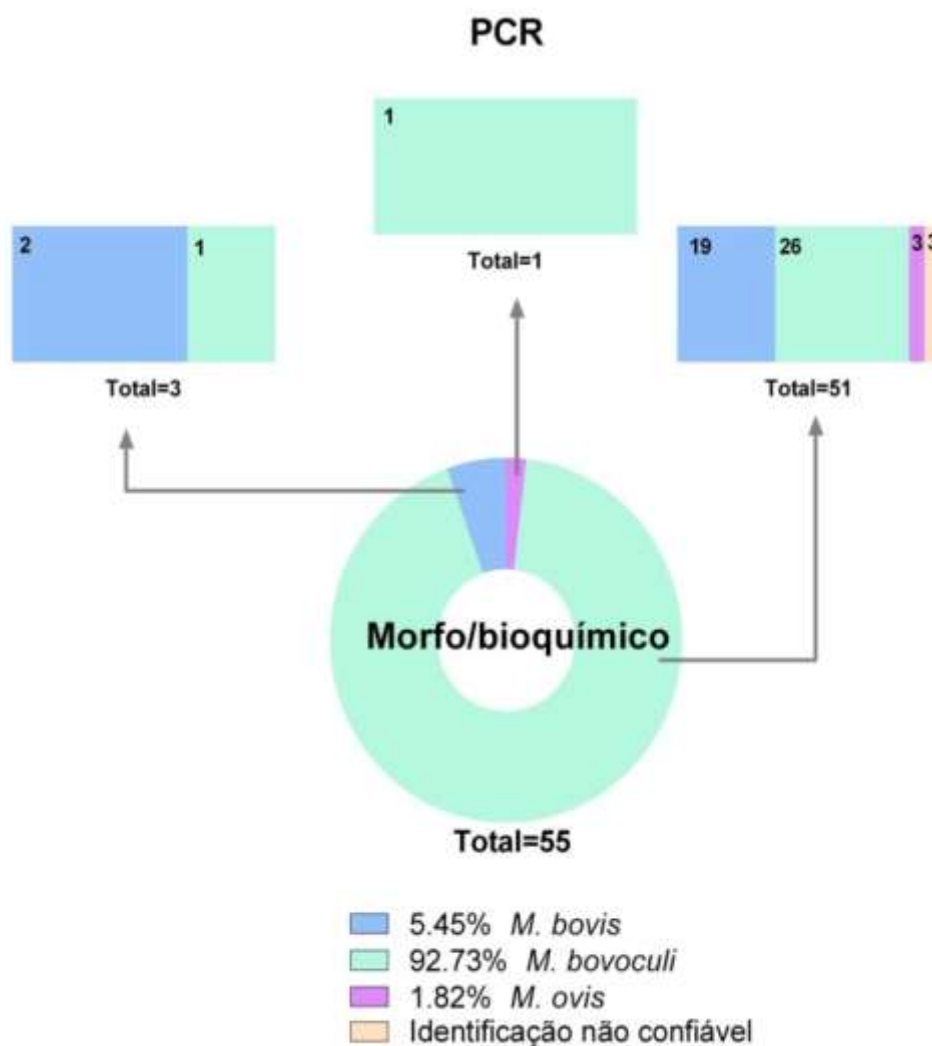


Figura 5: Comparação dos resultados entre o método convencional (morfo/bioquímico) e PCR para identificação dos isolados de *Moraxella* spp.

● MALDI-TOF x PCR

Entre as 34 cepas de *Moraxella* spp., 20 (58,82%) amostras apresentaram resultado similares quando comparadas as duas técnicas (Tabela 6). Logo, 14 (41,17%) dos isolados de *Moraxella* spp. apresentaram resultados diferentes entre as mesmas.

Das 34 cepas de *Moraxella* spp. (Figura 6), cinco foram identificados como *Moraxella bovis* e 14 como *Moraxella bovoculi* em ambas as técnicas, enquanto outros 10 isolados que apresentaram identificação não confiável pela técnica de MALDI-TOF, nove foram identificados pela técnica do PCR como: duas *Moraxella bovis* e sete *Moraxella bovoculi*. Ainda, uma das amostras não teve sua identidade confirmada perante as duas técnicas. Das amostras que a técnica de MALDI-TOF classificou como outra espécie bacteriana, por PCR foram identificadas como sendo:

uma *Moraxella bovis*, três *Moraxella bovoculi*, e uma das amostras não teve sua identidade confirmada.

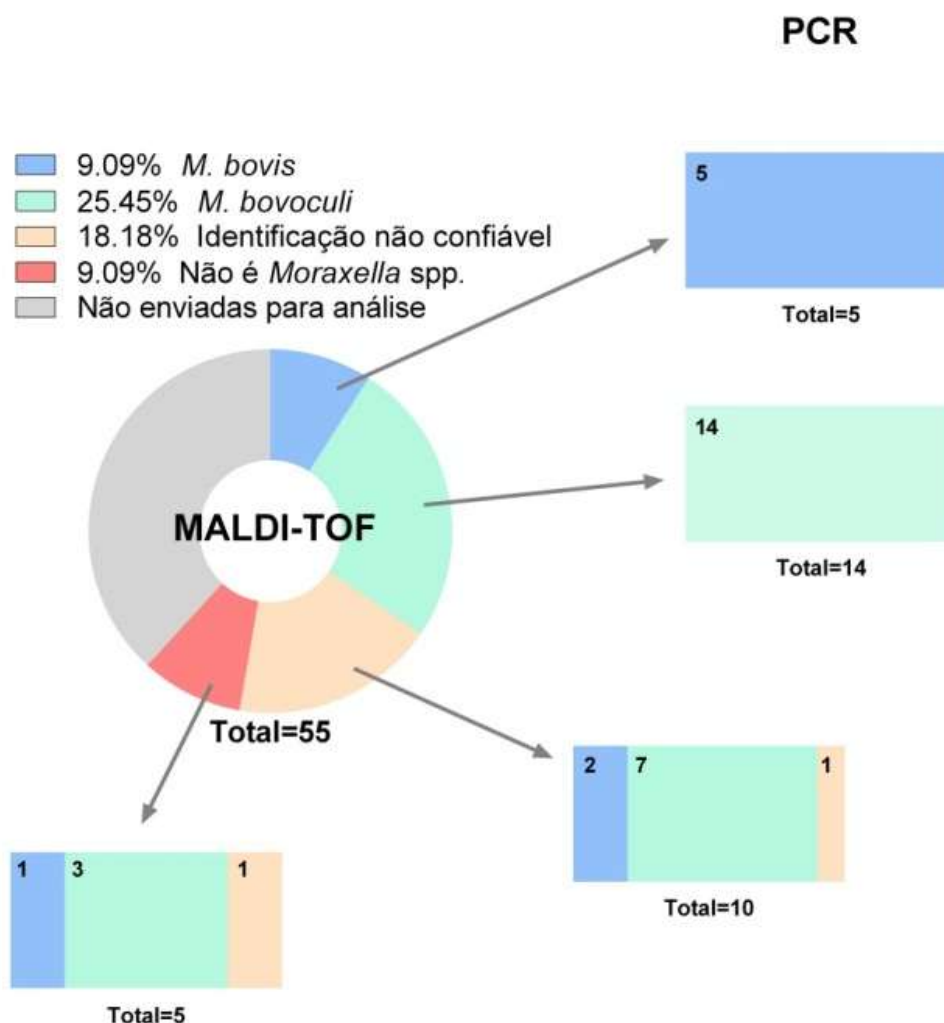


Figura 6: Comparação dos resultados entre o MALDI-TOF e PCR para identificação dos isolados de *Moraxella* spp.

Pavlovic et al. (2012), afirmam que a técnica de PCR apresenta alta seletividade e é adequada para identificação confiável de bactérias da espécie *Enterobacter cloacae*. Os mesmos autores afirmam que o uso exclusivo de MALDI-TOF não possui o poder discriminatório para a identificação clara e confiável de certas espécies de *Enterobacter cloacae* quando comparada com a técnica de PCR, resultados que corroboram com os aqui obtidos. No entanto, a combinação entre as técnicas de PCR e MALDI-TOF permitiu a identificação correta das respectivas espécies do complexo de *Enterobacter cloacae*.

● PCR x Sequenciamento

Entre as 26 cepas de *Moraxella* spp. submetidas às técnicas de PCR da região intergênica 16S-23S, seguida por clivagem por enzima de restrição e sequenciamento do DNA da mesma região (Figura 7), pôde-se notar que das 25 amostras (96,15%) apresentaram resultado em comum entre as técnicas: 19 *Moraxella bovis*, três *Moraxella bovoculi*, três *Moraxella ovis*, sendo que apenas uma amostra não apresentou resultado conclusivo (amostra possivelmente contaminada).

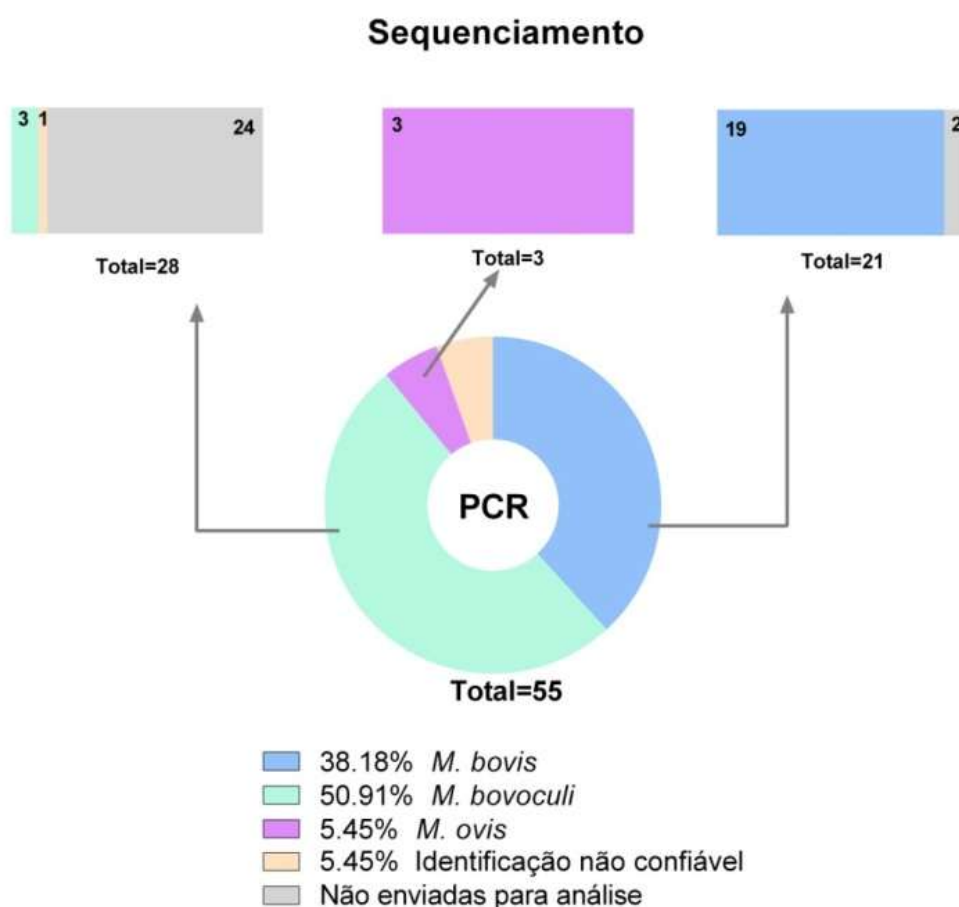


Figura 7: Comparação dos resultados entre o PCR e sequenciamento do DNA para identificação dos isolados de *Moraxella* spp.

A técnica de sequenciamento é considerada a metodologia de referência para a identificação bacteriana (NOLTE e CALIENDO 2003). Uma vez que a maior parte dos os agentes etiológicos envolvidos no surto de CIB foram corretamente detectados por meio da técnica de PCR e confirmados por sequenciamento (Tabela 6), pode-se concluir que a aplicação da técnica de PCR tem se mostrado uma alternativa eficiente para a detecção dos patógenos em questão.

4.3.6 Visão geral entre as técnicas morfotintorial/bioquímica, MALDI-TOF, PCR e sequenciamento.

Vale salientar que neste estudo as amostras de *Moraxella* spp. apresentaram elevado pleomorfismo, o que pode demonstrar que a morfologia bacteriana, visualizada pela técnica de Gram, é um critério pouco preciso para identificar espécies de *Moraxella* spp. (LIBARDONI et al., 2012), uma vez que 9 (16,36%) das cepas de *Moraxella bovis* isoladas neste estudo exibiam-se como diplococos, enquanto 7 cepas de *Moraxella bovoculi* (12,72%) apresentavam morfologia de cocobacilos e entre as *Moraxella ovis* duas tinham formato de diplococos e uma cocobacilos (Figura 8), resultados diferentes dos já apresentados na literatura (Tabela 2) (GOMES, 2012 e ANGELOS et al., 2007a).

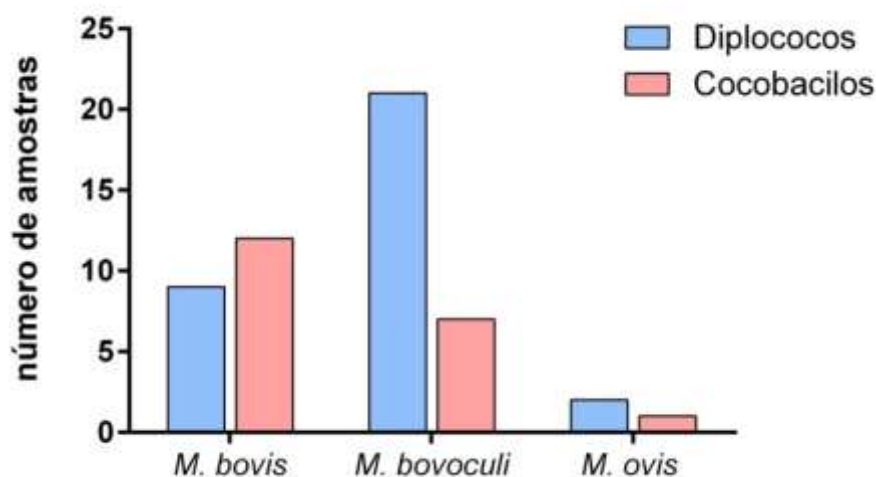


Figura 8: Morfologia dos isolados de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*, identificadas pela técnica de PCR e confirmadas por sequenciamento.

Os métodos convencionais de identificação bacteriana baseiam-se, essencialmente, na cultura do microrganismo, seguida por análise das características fenotípicas, provas bioquímicas e perfil enzimático (BOTARO, 2012). Em relação a qualquer novo método, o método convencional de identificação bacteriana apresenta a grande vantagem de ser utilizado há longo tempo e por ser reconhecido oficialmente (FRANCO, 1994). Por outro lado, dentre as principais desvantagens, se tem o tempo requerido para realização da análise, demora em obter os resultados, baixa repetibilidade, sensibilidade e especificidade dos resultados, além disso, está sujeita a falhas humana, no que diz respeito à execução da análise, leitura e interpretação dos resultados (BOTARO, 2012).

As técnicas de PCR e sequenciamento da região intergênica 16S- 23S dos isolados de *Moraxella* spp. podem ser empregadas na identificação dos agentes envolvidos em surtos de CIB, com o intuito de minimizar as desvantagens dos métodos convencionais, reduzindo o tempo de obtenção dos resultados, melhorar a produtividade laboratorial, aumentando a sensibilidade e especificidade dos resultados finais.

4.4 Conclusões

Todos os métodos avaliados foram efetivos na identificação do gênero *Moraxella*.

No comparativo com o sequenciamento da região intergênica 16S-23S, que é a prova conclusiva para a identificação de microrganismos, a PCR, seguida por clivagem por enzima de restrição, foi a que apresentou o melhor resultado, podendo ser considerada superior ao MALDI-TOF e, principalmente, à análise morfotintorial/bioquímica.

A identificação de espécies do gênero *Moraxella* spp por análises morfotintorial/bioquímicas foi insatisfatória, pois a especificidade destes testes frente à *Moraxella* spp. foi muito inferior à das demais técnicas.

A identificação bacteriológica por meio das técnicas de PCR, seguida por clivagem por enzima de restrição, é possível como alternativa para o diagnóstico de animais acometidos por CIB.

Referências

- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20-29, July 2017.
- ANGELOS, J. A. et al. *Moraxella bovoculi* spp. nov., isolated from calves with Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. **International Journal of System Evolution Microbiology**, London, v. 57, p. 789-795, Apr. 2007a.
- ANGELOS, J. A.; BALL, L. M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid *Moraxella* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 552-534, 2007.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley, 2003. 4755 p.
- BARNINI, S. et al. Rapid and reliable identification of gram-negative bacteria and gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 124, 2015.
- BARREIRO, J. R. **Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- BATINGA, M. C. A. **Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ampliação isotérmica de DNA medida por loop (LAMP)**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2017.
- BIER D, et al. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1373-1379, 2017.
- BROWN, M. H. et al. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, p. 259-266, July 1998.
- CAITANO, M. A. B. et al. Detecção de *Brucella abortus* em tecidos bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 497-502, Jun. 2014.
- CARBONNELLE, E. et al. MALDI – TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 104-109, 2011.
- CHERKAoui, A. et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1169-1175, 2010.

CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. *Moraxella bovis*: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 778-787, Jul. 2003.

CONWAY G. C. et al. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 103-112, 2001.

FILHO, F. A. et al. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1585-1591, 2014.

FRÁGUAS, S. A. et al. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 117-121, 2008.

FREIWALD A, SAUER S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 5, p. 732-742, 2009.

GERHARD, R. R., ALLEN, J. W.; GREENE, W. H. The role of face flies in an episode of Infectious Bovine-Keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 156-159. Jan. 1982.

GIL TURNES, C. **Ceratoconjuntivite bovina infecciosa**. In: RIET-CORREA, F. et al. Doenças de Ruminantes e Equinos. São Paulo: Livraria Varela, 2001. v. 1, p. 426.

GOULD, A. S. et al. Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 108–115, May. 2013.

KILLINGER, A. H. et al. Economic impact of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. **Veterinary Medical, Small Animal Clinician**, v. 72, p. 618-620, Apr. 1977.

KIRKPATRICK, J. G.; LALMAN, D. **Pinkeye in cattle infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK)**. Disponível em: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2689/VTMD9128web.pdf>> Acesso em: 23 maio. 2017.

LANGE, C. C. et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p. 36-40, Jan. 2011.

LEE, J. H. et al. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2010.

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, 2012.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MAIA, J. M. S. **Utilização de uma formulação de Cloxacilina nanoestruturada no tratamento da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina**. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras – Minas Gerais, 2015.

MARTINEZ, M. B.; TADEI, C. R. In: **Microbiologia**, TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. 4ª Ed, São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p.

NOLTE, F. S.; CALIENDO, A. M. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Pfaller, M. A.; Tenover, R. C. (Eds), **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. ASM Press, Washington, 2003.

PASTERNAK, J. **Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF**. Einstein, v. 10, p. 118-119, 2012.

PATEL, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, p. 564-572, 2013.

PAVLOVIC, M. et al. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. **FEMS Microbiology Letters**, v. 328, p. 46-53, Mar. 2012.

PEREIRA, R. E. P.; PETRECHEN, G. G. Principais Métodos Diagnósticos Bacterianos – Revisão De Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 16, Jan. 2011.

POSTMA, G. C.; CARFAGNINI, J. C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 81, p. 449-458, Nov. 2008.

REGITANO, L. C. A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: Regitano LCA, Coutinho LL eds. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2001. p. 180-86.

REZENDE, L. R. **Caracterização molecular da comunidade bacteriana em rebanhos leiteiros com mastite subclínica**. 2016. 91 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2016.

RIEDERER, K. et al. MALDI-TOF identification of gram-negative bacteria directly from blood culture bottles containing charcoal: Sepsityper® kits versus centrifugation-filtration method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 112, p. 24-27, 2015.

ROCHA, T. L. et al. Eletroforese bidimensional e análise de proteoma. Brasília, EMBRAPA - **CENARGEN**, 2005. 12p. (EMBRAPA - CENARGEN. Comunicado Técnico, 136).

SAUER S, et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **PLoS One**, v. 30, 2008.

SCHULTHESS, B. et al. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Fastidious Gram-Negative Rods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 543-548, 2016.

SILVA, D. A. V. **Comparação entre métodos de diagnóstico da tuberculose em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do estado de São Paulo**. 2015. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual de São Paulo – Jaboticabal, 2015.

SLATTER, D. H.; EDWARDS, M. E.; HAWKINS, C.D. A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 59, p. 65-68, Sep. 1982.

SPANU, T. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to rpoB gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 44-49, 2011.

STEVENSON, L. G.; DRAKE, S. K.; MURRAY, P. R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 444-447, mar. 2010.

SUTTON, S. V. W.; CUNDELL A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharmacopeial Forum**, v. 30, p. 1884-1894, set./ out. 2004.

TIMBÓ R. V. et al. Mitogenome sequence accuracy using different elucidation methods. **PLoS ONE**, v. 12, 2017.

VERBISCK, N. V. et al. **Structural characterization of Mycobacterium bovis recombinant antigens by MALDI-TOF mass spectrometry**. In: International Mass Spectrometry School, 2013, Siena, Italia. International Mass Spectrometry School - Advances in identification and structural characterization of bioactive molecules, 2013.

5 Capítulo 2 – Diversidade genética de amostras de *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* isoladas de bovinos Hereford pertencentes a cinco municípios da região do Pampa Gaúcho

5.1 Introdução

A Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB) é a doença ocular de maior importância na produção bovina (WILCOX, 1970; BROWN et al., 1998), e tem como principais sintomas: lacrimejamento intenso, fotofobia, inchaço conjuntival, opacidade no centro da córnea e ulceração (POSTMA et al., 2008). A CIB não é uma enfermidade fatal, porém seu impacto econômico no rebanho bovino é significativo (SLATTER et al., 1982, TROUTT e SCHURIG, 1985, SHRYOCK et al., 1998, MARRION e RILEY, 2000), uma vez que as estratégias de prevenção e tratamento na maioria das vezes se mostram ineficientes (SOSA e ZUNINO, 2013).

O agente etiológico da CIB é *Moraxella bovis*, uma bactéria Gram-negativa, amplamente disseminada e altamente contagiosa (McCONNEL et al., 2007). Trata-se de um microrganismo oportunista que faz parte da microbiota ocular e nasal de animais, tanto acometidos por CIB, quanto sadios (POSTMA et al., 2008; CONCEIÇÃO e TURNES, 2003). No entanto, alguns autores afirmam que outras duas bactérias: *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* estão associadas a diversos casos de CIB (ANGELOS et al., 2007; SOSA et al., 2012; GOULD et al., 2013), porém, o papel dessas bactérias como agente causal ainda não está completamente definido, uma vez que a infecção experimental com estas bactérias falhou em provocar a doença (ANGELOS, 2015). Desta forma, *Moraxella bovis* é o único agente etiológico reconhecido para essa doença (ANGELOS, 2010).

Apesar da existência de vacina contra CIB, a profilaxia é, em geral, prejudicada por situações de ineficácia de vacinas comercialmente disponíveis (O'CONNOR et al., 2011), o que pode ser explicado pela variação genética e antigênica entre as cepas de *Moraxella bovis* e a presença de outros microrganismos envolvidos na enfermidade (BROWN et al., 1998).

O desenvolvimento das técnicas moleculares possibilitou a caracterização das diferenças genéticas entre os isolados bacterianos. A variabilidade genética bacteriana pode ser estimada pela comparação entre fragmentos de DNA, de tamanhos distintos, gerados a partir da amplificação por PCR, com a utilização de

primers específicos (SAIKI et al., 1988). No entanto, os estudos sobre a diversidade genética das bactérias *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* são escassos.

Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de bactérias *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* isoladas de surtos de CIB entre 2015 e 2017 pertencentes a cinco municípios do Rio Grande do Sul utilizando as técnicas de ERIC-PCR, RAPD-PCR e uma variação do RAPD-PCR com os *primers* JWP1 e JWOPA07.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Isolados bacterianos

Foram utilizados 32 isolados bacterianos provenientes de secreções oculares de 28 bovinos Hereford, pertencentes a seis propriedades localizadas em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul (Tabela 7).

Tabela 7: Características moleculares das amostras de *Moraxella* spp. isoladas de CIB, em cinco municípios do Rio Grande do Sul.

Nº	Isolado	Origem	Ano	Homologia
1	151 OE	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovis</i>
2	Taim - 2	Rio Grande	2016	<i>Moraxella bovis</i>
3	171 OD	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovis</i>
4	171 OE	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovis</i>
5	324 OE	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovis</i>
6	6213 OD	Dom Pedrito	2016	<i>Moraxella bovis</i>
7	391 OD	Alegrete	2017	<i>Moraxella bovis</i>
8	391 OE	Alegrete	2017	<i>Moraxella bovis</i>
9	976 OD	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovis</i>
10	128 OE	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovis</i>
11	6587 ND	Dom Pedrito	2017	<i>Moraxella bovis</i>
12	6587 OD	Dom Pedrito	2017	<i>Moraxella bovis</i>
13	6219 OD	Dom Pedrito	2016	<i>Moraxella bovis</i>
14	6456 OE	Dom Pedrito	2016	<i>Moraxella bovis</i>
15	666 OD	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
16	Taim - 1	Rio Grande	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
17	Jur- Taim - 3	Santa Vitória do Palmar	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
18	6052 OE	Dom Pedrito	2015	<i>Moraxella bovoculi</i>
19	1368 OD	Dom Pedrito	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
20	1138 OE	Dom Pedrito	2017	<i>Moraxella bovoculi</i>
21	1192 OD	Dom Pedrito	2017	<i>Moraxella bovoculi</i>

OD = Olho Direito / OE = Olho Esquerdo / ND= Narina Direita e NE = Narina Esquerda.

Continua.

Tabela 7: Características moleculares das amostras de *Moraxella* spp. isoladas de CIB, em cinco municípios do Rio Grande do Sul.

Nº	Isolado	Origem	Ano	Homologia
22	281 OD	Uruguaiana	2017	<i>Moraxella bovoculi</i>
23	5623 OE	Dom Pedrito	2015	<i>Moraxella bovoculi</i>
24	144 NE	Uruguaiana	2017	<i>Moraxella bovoculi</i>
25	330 NE	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
26	259 OD	Dom Pedrito	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
27	29 OE	Alegrete	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
28	1295 OD	Dom Pedrito	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
29	1362 OE	Dom Pedrito	2016	<i>Moraxella bovoculi</i>
30	1213 NE	Dom Pedrito	2017	<i>Moraxella bovoculi</i>
31	120 ND	Uruguaiana	2015	<i>Moraxella bovoculi</i>
32	120 OD	Uruguaiana	2015	<i>Moraxella bovoculi</i>

OD = Olho Direito / OE = Olho Esquerdo / ND= Narina Direita e NE = Narina Esquerda.

5.2.2 Extração de DNA dos isolados bacterianos

O protocolo para extração de DNA genômico dos 32 isolados utilizado neste estudo, foi adaptado a partir do protocolo desenvolvido por Ausubel et al. (2003), exemplificado e aplicado no capítulo anterior (4 Capítulo 1).

5.2.3 Amplificação do DNA por PCR

O DNA dos 32 isolados bacterianos foi utilizado como “DNA molde” para as análises de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)-PCR, JWP1 - JWOPA07 e ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consenso*)-PCR.

5.2.3.1 Seleção dos *primers* para RAPD

Inicialmente foram testados 20 *primers* decâmeros (OPA-01 à OPA-20) (Tabela 8) fabricados pela empresa SIGMA® em quatro amostras de DNA escolhidas de forma aleatória. As reações de amplificação foram preparadas segundo Angelos e Ball (2007), (Tabela 9).

Tabela 8: *Primers* RAPD testados para diversidade genética de *Moraxella* spp.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPA-08	GTGACGTAGG	OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPA-09	GGGTAACGCC	OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-03	AGTCAGCCAG	OPA-10	GTGATCGCAG	OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-04	AATCGGGCTG	OPA-11	CAATCGCCGT	OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPA-12	TCGGCGATAG	OPA-19	CAAACGTCGG
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPA-13	CAGCACCCAC	OPA-20	GTTGCGATCC
OPA-07	GAAACGGGTG	OPA-14	TCTGTGCTGG		

Tabela 9: Reação utilizada para a amplificação por RAPD, para cada amostra, para seleção dos *primers*

Reagentes (concentração inicial)	Concentração Final	Volume
Água ultra pura	-	q.s.p
Tampão de PCR (5X)	1 X	5µL
MgCl ₂ - (25mM)	2,50 mM	2,5µL
Mix de dNTP - (10mM)	0,10 mM	0,25µL
Primer - (10nmol)	0,40 (µmol/µL)	1µL
Taq DNA Polimerase - (5U/µL)	1 U	0,20µL
Amostra de DNA (15 ng/ µL)	45 ng	3µL
Volume Final	-	25µL

As amplificações foram feitas em termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradient S[®], sob as condições de desnaturação inicial 94 °C por 5 minutos, seguidos por 45 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 36 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os Fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) com TBE 1X (Tris-base pH 8, EDTA e ácido bórico) por aproximadamente seis horas à voltagem constante de 110V, juntamente com um padrão de molecular de 200pb (200pb DNA Ladder-Ludwig Biotec). As bandas foram coradas adicionando em cada uma das amostras 2 µL de solução de GelRed[™] (Nucleic Acid Gel Stain). Posteriormente à corrida, os resultados foram revelados com o auxílio de um sistema de captura de imagens acoplado a um transiluminador UV (UVITEC Imaging Systems).

5.2.3.2 Amplificação do DNA por RAPD

Com as alíquotas de cada amostra de DNA, obtidas pelo protocolo de extração exemplificado anteriormente, foram realizadas as reações de amplificação por PCR-RAPD com os *primers* previamente selecionados (Item 5.2.3.1). As reações utilizadas e as condições de amplificação para as amostras do gênero *Moraxella* foram as mesmas empregadas para a seleção dos *primers* RAPD, explicado no item 5.2.3.1.

5.2.3.3 Amplificação do DNA por JWP1-JWOPA07 e ERIC-PCR

O grau de diversidade genética entre os isolados de *Moraxella* spp. também foi investigada por meio de variações do tamanho de sequências do tipo JWP1-JWOPA07 e ERIC. As regiões JWP1-JWOPA07 e ERIC foram amplificadas por meio

da técnica de PCR, utilizando os *primers*: JWP1 (5'-GCACTGAAGTGACCAAGCGG-3') e JWOPA7 (5'-GAAACGGGTG-3'), utilizados para amplificar as sequências JWP1-JWOPA07 e ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC-2 (5'-AAGTAGTGACTGGGGTGAGCG-3') utilizados para amplificar as sequências ERIC (SOSA et al., 2013).

As reações de JWP1 - JWOPA07 e ERIC-PCR possuíram volume final de 25 µL, apresentadas na Tabela 10. As condições de amplificação para JWP1-JWOPA07 foram às mesmas empregadas ao PCR-RAPD (5.2.3.1.). Já para o ERIC-PCR as condições de amplificação diferem, sendo composta por uma desnaturação inicial 94 °C por 5 min., seguidos por 45 ciclos a 94 °C por 1 min., 52 °C por 1 min. e 72 °C por 2 min. e extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Tabela 10: Reação utilizada para a amplificação por JWP1-JWOPA07 e ERIC-PCR

Reagentes (concentração inicial)	Concentração Final	Volume
Água ultra pura	-	q.s.p
Tampão de PCR (5X)	1 X	5µL
MgCl ₂ - (25mM)	2,50 mM	2,5µL
Mix de dNTP - (10mM)	0,15 mM	0,38µL
Primer F - (10nmol)	0,60 (µmol/µL)	1,5µL
Primer R - (10nmol)	0,60 (µmol/µL)	1,5µL
Taq DNA Polimerase - (5U/µL)	1 U	0,20µL
Amostra de DNA (25 ng/ µL)	45 ng	1,8µL
Volume Final	-	25µL

Os produtos das reações foram analisados a partir de eletroforeses em gel de agarose (1,8%), em tampão TBE 1X, por aproximadamente seis horas à voltagem constante de 110V, juntamente com um padrão de molecular de 100pb (100pb DNA Ladder -Ludwig Biotec). O gel foi corado por submersão em solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL por 30 minutos, sob agitação. Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotodocumentados sob luz ultravioleta, com o sistema de imagem UV (UVITEC Imaging Systems).

5.2.4 Análise estatística dos dados

Após a interpretação dos géis, apenas as bandas nítidas, de alta intensidade e reprodutibilidade foram consideradas nas análises, como recomendado por Pérez et al. (1998). Com isso construiu-se uma matriz com dados binários (presença = 1 ou ausência = 0 de bandas nas amostras). A matriz obtida foi utilizada para a

quantificação da diversidade genética entre cepas de *Moraxella bovis* e de *Moraxella bovoculi* presente na região sul do estado do Rio Grande do Sul por meio do *software* Genes v. 1990.2007.59 (Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética) (CRUZ, 2008). As estimativas de similaridade genética (sg_{ij}) entre cada par de linhagens (i,j) foram obtidas por meio do coeficiente de similaridade Dice (REIF et al., 2005), respeitando o intervalo de ocorrência entre 1 (clones) a 0 (altamente divergentes), explicada pela seguinte fórmula:

$$sg_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Em que, nessa situação, a é o número de marcas para os quais ambos os genótipos tiveram o código 1 (presença de banda); b é o número de códigos 0 (ausência de banda) no genótipo i e 1 para o genótipo j ; c é o número de códigos 1 no genótipo i e 0 (ausência de banda) para o genótipo j . Genótipos que possuem maior coincidência de presenças e/ou ausência de bandas são considerados mais similares entre si, ou seja, quanto maior o valor observado de sg_{ij} , mais parecido são os indivíduos, ou contrário, quanto menor o valor observado de sg_{ij} , menos parecido são os indivíduos ($dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$) (MEYER, 2002).

A análise de agrupamento (dendogramas) foi realizada por meio da matriz das estimativas de dissimilaridade (dg_{ij}), com o emprego do método da média não ponderada da dissimilaridade - UPMGA (*Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Averages*). Pelo método de ligação média entre grupos não ponderados (UPMGA), utilizam-se médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre as amostras de genótipo consideradas (CRUZ e CARNEIRO, 2003).

5.3 Resultados e Discussão

A diversidade genética de um amplo grupo de *Moraxella* spp. coletadas de cinco municípios localizados no estado do Rio Grande do Sul em surtos de CIB entre os anos de 2015 a 2017 foram analisadas por impressões digitais do DNA por meio da técnica de RAPD-PCR, JWP1-JWOPA07 e ERIC-PCR. Dos 20 *primers* RAPD testados, sete foram selecionados (OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-07, OPA-09, OPA-11 e OPA-13), por serem mais informativos e produzirem bandas mais nítidas. Estes *primers* geraram 107 produtos de ampliações (bandas) analisáveis, com

média de 12 bandas por *primer*, com variações de seis (OPA-07) a 19 (OPA-03) bandas analisáveis.

Com base no dendrograma obtido a partir das análises de padrões de bandas geradas por RAPD-PCR, JWP1 - JWOPA07 e ERIC-PCR pôde-se observar a formação de dois principais grupos geneticamente diferenciados (clados), em que, das 32 cepas bacterianas 14 foram classificadas como *Moraxella bovis* e 18 como *Moraxella bovoculi* (Figura 9). De acordo com os valores de *bootstrap* calculados, os dois clados possuem grande estabilidade, sendo 75,05% e 89,85% para *M. bovis* e *M. bovoculi*, respectivamente.

As distâncias genéticas entre as amostras de *Moraxella bovis* variaram de 0,0379 (3,79%) a 0,4285 (42,85%), com média de 0,1970 (19,70%). Os menores valores de dissimilaridade foram registrados entre as cepas 391 OD e 171 OD coletadas de dois animais distintos pertencentes à mesma propriedade localizada no município de Alegrete – RS. Por outro lado, as amostras 6213 OD e 391 OE foram as mais distantes geneticamente, ambas coletadas de animais distintos pertencentes aos municípios de Dom Pedrito e Alegrete. Existem duas amostras de *Moraxella bovis* isoladas no mesmo surto de um mesmo animal, porém obtidas uma em cada olho (391 OD e 391 OE), que não são clones e apresentaram-se relativamente distantes geneticamente (Figura 9). Embora a diversidade genética em *Moraxella* spp. (VERHAEGH et al., 2010) seja bem documentada, a co-infecção de um mesmo animal com cepas geneticamente distintas, é um fenômeno raro de ser detectado, embora, para outras bactérias este fenômeno já tenha sido descrito (OGLE e VASIL, 1991; GASPAR et al., 2011), podendo ser um fator complicante no tratamento de infecções, pois cepas distintas podem apresentar distintos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos (GASPAR et al., 2011).

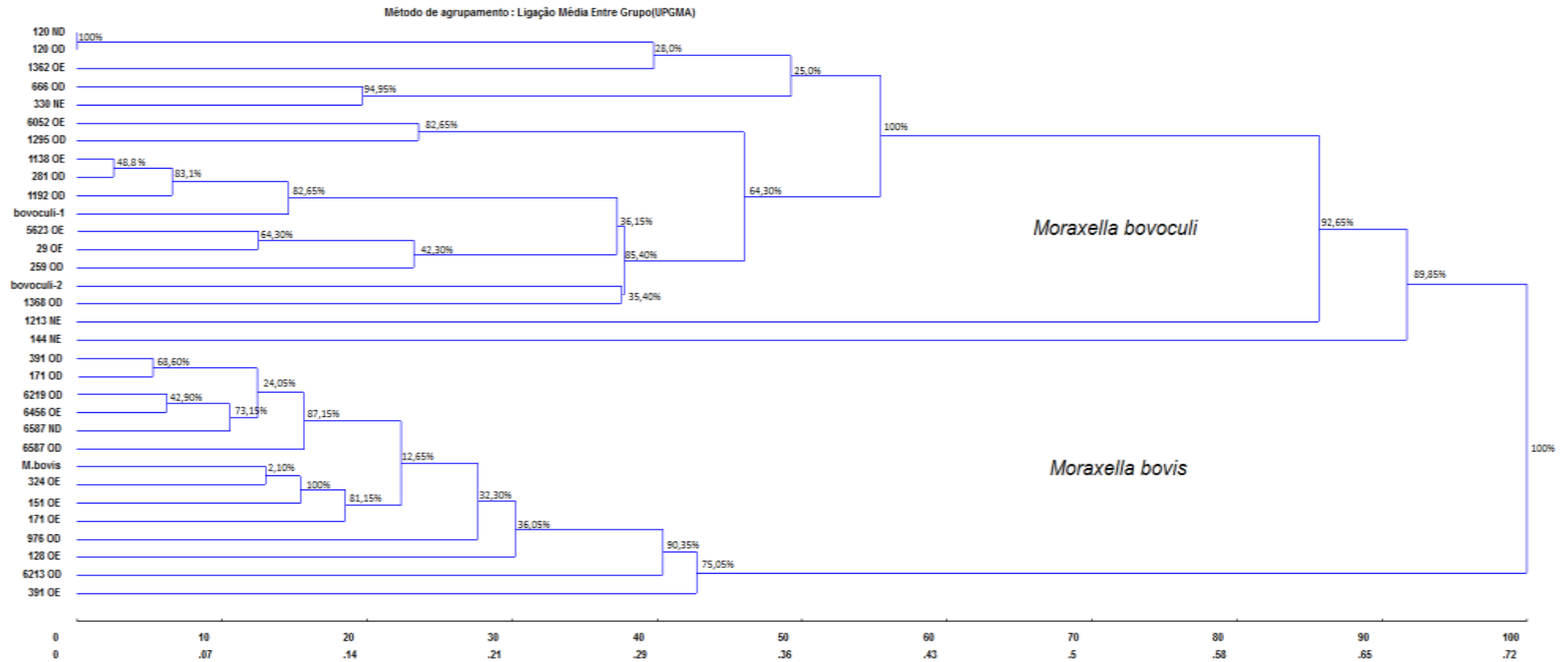


Figura 9: Dendrograma representando as relações genéticas entre isolados de *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* pelo método do UPGMA. Valores de bootstrap representados na árvore (2000 *bootstrap*).

Os valores de dissimilaridades entre as *Moraxellas bovoculi* variaram entre zero (clone) a 0,9354 (93,54%), com média de 0,3962 (39,62%). A análise de dissimilaridade genética mostrou que dentre as amostras estudadas existem duas que, possivelmente, são clone. Elas pertencem ao mesmo bovino, trata-se das amostras 120 OD e 120 ND pertencentes ao município de Uruguaiana (Figura 9). O mais elevado índice de divergência genética foi verificada entre as amostras 144 NE e 1213NE, sendo essas amostras coletadas de diferentes animais da raça Hereford pertencentes a duas fazendas distintas localizadas nos municípios de Uruguaiana e Dom Pedrito, respectivamente. Com isso, a análise comparativa indicou que a variabilidade genética entre as cepas de *Moraxella bovoculi* foi maior que a entre as cepas de *Moraxella bovis*.

Sosa e Zunino (2013), avaliando a diversidade genética entre isolados de *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* pertencentes a várias províncias do Uruguai entre os anos de 1983 e 2009 confirmaram a alta diversidade genotípica entre isolados, o que pode ser um problema sério para o projeto de vacinas contra a CIB. Farias et al. (2015) examinaram a região 3' do gene *rtxA* de 35 estirpes de *Moraxella* spp. isoladas de bovinos e ovinos entre os anos de 1986 a 2013 e concluíram que a análise filogenética a partir de citotoxina de cepas de *Moraxella* spp. indicando uma clara diferenciação entre espécies.

5.4 Conclusões

Com base nos resultados apresentados neste capítulo, foi confirmada a existência de variabilidade genética entre as cepas de *Moraxella bovis* e *Moraxella bovoculi* isoladas de bovinos da raça Hereford, acometidos por Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina, pertencentes a cinco diferentes municípios situados no estado do Rio Grande do Sul.

Referências

- ANGELOS, John A. Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 61-79, 2015.
- ANGELOS, J. A. et al. Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin – ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Research Communication**, v.34, p.229-239, Mar. 2010.
- ANGELOS, J. A. et al. *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 789–795, 2007.
- ANGELOS, J. A.; BALL, L. M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid *Moraxella* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 552-534, 2007.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley , 2003. 4755 p.
- BROWN, M. H. et al. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, p. 259-266, 1998.
- CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. *Moraxella bovis*: influência das características genóticas e fenóticas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 778-787, jul./ago. 2003.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV. Viçosa (MG). 278p. 2008.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Volume 2. Viçosa: UFV, 2003. 623p.
- FARIAS, L. A. **Análise genotípica e filogenética com base nos genes do pilus tipo IV de *Moraxella bovis* e citotoxina de *Moraxella Bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis***. 2015. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2015.
- Gaspar, E. B. et al. Genetic heterogeneity of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates co-infecting the cerebrospinal fluid of a pediatric patient. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 4, p. 568-70. Aug. 2011.
- GOULD, A. S. et al. Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 108–115, May. 2013.
- MARRION, R. M.; RILEY, L. K. Detection of cell detachment activity induced by *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 9, p. 1145-1149, 2000.

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

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridades usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 118f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo – Piracicaba, 2002.

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

OGLE, J. W.; VASIL, M. L. Genetic heterogeneity in strains of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 663–665, 1991.

POSTMA, G. C.; CARFAGNINI, J. C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 81, p. 449-458, Nov. 2008.

REIF, J. C.; MELCHONGER, A. E.; FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 1, p. 1-7, Jan./Feb. 2005.

SAIKI, R. K. et al. *Primer* directed enzymatic amplification DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487- 491, Jan. 1988.

SHRYOCK, T. R.; WHITE, D. W.; WERNER, C. S. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 305-309, 1998.

SLATTER, D. H. et al. A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p. 65-72, 1982.

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

SOSA, V.; ZUNINO, P. Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated to infectious bovine keratoconjunctivitis. **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, 2013.

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

VERHAEGH, S. J. et al. Colonization of healthy children by *Moraxella catarrhalis* is characterized by genotype heterogeneity, virulence gene diversity and co-

colonization with *Haemophilus influenzae*. **Microbiology**, v. 157, p. 169-178. doi: 10.1099/mic.0.042929-0. Epub 2010 Sep 16. Jan. 2011.

WILCOX, G. E. The etiology of infectious bovine keratoconjunctivitis in Queensland. 1. *Moraxella bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 46, p. 409-414, 1970.

6 Capítulo 3 – Estimação dos parâmetros e valores genéticos para a susceptibilidade à Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina

6.1 Introdução

A produção da pecuária, assim como as demais atividades agrícolas, busca por bons resultados, sendo que a eficiência e a lucratividade de um sistema tornaram-se pontos chave para o sucesso da atividade. No entanto, o índice de produtividade do rebanho bovino de corte brasileiro ainda está abaixo do seu real potencial. Entre os fatores que influenciam os baixos índices zootécnicos e, consecutivamente, a produtividade, estão os problemas sanitários e a composição genética dos rebanhos.

Problemas sanitários são, em grande maioria, limitantes da produtividade e demandam intenso uso de insumos químicos, nem sempre eficazes, no tratamento das enfermidades. Entre as principais enfermidades que afetam a produtividade em bovinos está a Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB). A CIB é a afecção ocular de maior relevância para a criação de bovinos em todo o mundo. Apesar de raramente fatal, motiva consideráveis perdas econômicas na produção do rebanho (SLATTER et al., 1982, TROUT e SCHURIG, 1985, SHRYOCK et al., 1998, MARRION e RILEY, 2000) e é caracterizada por alta morbidade, pois pode afetar até 80% dos animais (POSTMA et al. 2008). A doença tem como agente etiológico a *Moraxella bovis* (WILCOX, 1970, CHANDLER et al., 1979), única bactéria capaz de reproduzir a doença de acordo com os postulados de Koch (KODJO et al., 1994).

O melhoramento genético animal visa melhorias nas características de interesse zootécnico, por meio do aumento da frequência de alelos ou a combinação de alelos favoráveis a estas características nos rebanhos. Na prática, o melhoramento genético visa aumentar a eficiência produtiva de um rebanho buscando selecionar e dirigir sistemas de acasalamento entre animais mais adaptados ao meio, principalmente no que diz respeito à resistência frente às doenças e parasitas (CARDOSO et al., 2013; NIETO et al., 2013). Assim, a identificação precisa dos animais que possuem os genótipos de interesse é o ponto chave para o sucesso do processo de melhoramento (EUCLIDES FILHO, 1999).

O processo de avaliação genética animal envolve três fases. São elas basicamente: 1) Estimação dos parâmetros genéticos (variância fenotípica, genética e ambiental), essenciais para a obtenção de parâmetros, valores genéticos e na adequação aos métodos de seleção (KENNEDY, 1981), pois podem restringir o conhecimento preciso das frações genéticas das não genéticas. 2) Predição dos valores genéticos, é necessário o conhecimento das magnitudes das variâncias genéticas aditivas e fenotípicas das características avaliadas ou de suas herdabilidades (CARNEIRO Jr. et al., 2004) e 3) Classificação dos animais selecionados para a reprodução, com base nos seus valores genéticos.

Conhecer os parâmetros genéticos das características a serem utilizadas como critérios de seleção é de fundamental importância, pois com sua estimação é possível prever respostas diretas e correlacionadas à seleção, elaborar índices e prever o valor genético dos animais (FARIA et al., 2007). A herdabilidade de uma característica é o parâmetro de maior relevância para a determinação da estratégia de melhoramento a ser usada em determinado rebanho, visto que esta mede a capacidade de transmissão de uma característica à sua progênie (FALCONER E MACKAY, 1996). A estimativa de herdabilidade é calculada pela razão da variância genética aditiva sobre a variância fenotípica.

Existem estudos para quantificar as variações genéticas na susceptibilidade à CIB (KIZILKAYA et al., 2013; SNOWDER et al., 2005), sendo que o gado da raça Hereford é mais sensível a CIB em comparação às raças Angus, Charolês, Limousin, Red Poll, entre outras (FRISCH, 1995). Entretanto, poucos estudos na literatura relatam valores de herdabilidade para a susceptibilidade a CIB, em bovinos Hereford.

O presente estudo teve como objetivo estimar os parâmetros e valores genéticos por meio da avaliação tradicional pelo modelo animal de limiar para a incidência de ceratoconjuntivite infecciosa bovina em bovinos da raça Hereford.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Dados

Durante o surto de CIB, entre os anos de 2015 a 2017, foram monitorados 652 bovinos da raça Hereford provenientes de quatro fazendas vinculadas ao programa de melhoramento genético da associação de criadores Conexão Delta G, criados no Rio Grande do Sul.

Foram realizadas quatro visitas (avaliações) em cada propriedade, com intervalo de aproximadamente 30 dias. O monitoramento teve como finalidade acompanhar a evolução do surto de CIB nas propriedades por meio da fenotipagem com relação à susceptibilidade à doença, a partir da atribuição de escores de lesão ocular. Para cada olho foi atribuído um escore específico. Foram atribuídos escores variáveis entre 0 e 4, como apresentados na Tabela 11. Ao avaliar a pigmentação ocular foi observada a porcentagem de área pigmentada ao redor de toda a mucosa ocular nos dois olhos, então foi atribuído o escore 1 a 3, sendo que valor 1 representa a ausência de pigmentação ocular, 2 parcialmente pigmentado e 3 mucosa ocular totalmente pigmentada (CARDOSO & LOPA, 2010).

Tabela 11: Escores de lesão de CIB.

	Escores	Características
$y = D/E, i^*$	0	Olho normal, sem lesão.
	1	Lacrimejamento, mas sem lesão conjuntiva/ córnea.
	2	Úlceras na córnea com até 4 mm de diâmetro
	3	Úlceras maiores de 4 mm
	4	Rompimento da úlcera - cegueira permanente

Fonte: A autora

* $y = D/E, i$ é escore para CIB para o olho direito (D) ou olho esquerdo (E) do animal i ($i=1,...,n$).

Por meio do coeficiente de correção de Spearman verificou-se a correlação entre pigmentação ocular e graus de lesão. Essa estimativa foi analisada no programa estatístico R (versão 3.02).

Para a estimação dos parâmetros e valores genéticos para CIB três modelos distintos de classificação, incluindo diferentes categorias foram avaliados, sendo eles:

1) Classificação para duas categorias: os escores de CIB do olho direito e esquerdo foram agrupados para formar a classificação contendo duas categorias

(c_2): categoria 1, quando ambos os olhos não foram afetados (animal sadio); categoria 2, um ou ambos os olhos foram afetados com qualquer escore de doença (escore ≥ 0 uni ou bilateral).

$$yc_{2,i} = \begin{cases} 1 & yD,i = 0 \text{ e } yE,i = 0, \\ 2 & \text{caso contrário} \end{cases}$$

2) Classificação para três categorias: na classificação da ocorrência de CIB em três categorias (c_3) foram adotados os seguintes critérios: categoria 1, quando ambos os olhos não foram afetados (animal sadio); categoria 2 quando apenas um dos olhos foi afetado (escore ≥ 0 unilateral) ou 3 quando ambos os olhos foram afetados (escore ≥ 0 bilateral).

$$yc_{3,i} = \begin{cases} 1 & yD,i = 0 \text{ e } yE,i = 0, \\ 2 & yD,i \neq 0 \text{ ou } yE,i \neq 0, \\ 3 & yD,i \neq 0 \text{ e } yE,i \neq 0 \end{cases}$$

3) Classificação para nove categoria: os escores de CIB do olho direito e esquerdo também foram agrupados para formar a classificação envolvendo nove categorias (c_9): soma dos escores de lesão do olho direito com olho esquerdo somando +1, com o intuito de excluir os escores zero das avaliações. Neste modelo também se leva em conta a gravidade das lesões, e não apenas a presença ou ausência da doença. Como exemplo: um animal com escore de lesão 2 no olho direito e escore 1 no olho esquerdo, fica classificado como 4

$$yc = 9, i = \begin{cases} 1 \\ 2 \\ 3 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ 8 \\ 9 \end{cases} \quad yD,i + yE,i + 1$$

O arquivo inicial continha 2053 (soma dos animais avaliados nas quatro visitas) registros de avaliação para CIB. O arquivo de dados possui quatros campos: identificação do animal; grupo contemporâneo, idade do individuo no dia da avaliação; quadrática para idade no momento da avaliação e os escores para cada categoria (*c_2*; *c_3* ou *c_9*). O arquivo de pedigree foi constituído de 263.450 observações, foi montado a partir das informações de parentesco dos 652 animais avaliados frente à CIB e possui identificação do animal, pai, mãe e ano de nascimento.

6.2.2 Análise estatística

Os componentes de variâncias das categorias (*c_2*; *c_3* e *c_9*) de CIB foram estimadas por inferência Bayesiana pelo modelo animal de limiar (*threshold*) unicaracterísticas. As análises foram realizadas no *software* Thrgibbs1f90 (TSURUTA e MISZTAL, 2006), que estima os componentes de (co) variâncias, bem como as soluções para os efeitos sistemáticos incluídos nos modelos. As análises das estimativas *a posteriori* foram obtidas no aplicativo Postgibbsf90 (MISZTAL et al., 2002). Os grupos de contemporâneos (GC) foram compostos por animais de mesma fazenda, sexo, ano e estação de nascimento. Foram utilizados como efeitos sistemáticos os grupos contemporâneos, o efeito da covariável linear e quadrática para idade no momento da avaliação.

O modelo matemático nas análises unicaracterísticas pode ser descrito de forma matricial, pela seguinte equação:

$$y = X\beta + Z_1a + Z_2p + e,$$

Em que,

y = é o vetor das variáveis subjacentes não observáveis;

β , a , p e e são os vetores dos efeitos sistemáticos de GC e covariáveis, dos efeitos genéticos aditivos diretos, do efeito de ambiente permanente de animal e dos efeitos residuais, respectivamente;

X é a matriz de incidência dos efeitos sistemáticos de GC e das covariáveis;

Z_1 e Z_2 são as matrizes de incidência dos efeitos genéticos aditivos diretos e de ambiente permanente de animal, respectivamente.

Por esse modelo verifica-se que uma observação (y) em determinado animal, pode ser influenciada pelos efeitos ambientais identificáveis (β), efeitos genéticos (a), efeitos de ambiente permanente (p) e efeitos ambientais não identificáveis ou aleatórios (e). Com isso, possibilita a estimação dos valores genéticos (EBV) dos animais, a partir de análises estatísticas dos valores medidos (fenotípicos) diretamente nos animais (RESENDE e PEREZ, 1999).

A partir do modelo acima, os valores genéticos dos animais podem ser preditos a partir da resolução de um sistema de equações, denominado equação de modelos mistos. São válidas as seguintes condições:

$$Var \begin{bmatrix} a \\ p \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 & 0 \\ 0 & A\sigma_p^2 & 0 \\ 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix},$$

em que

A é a matriz de parentesco;

I é a matriz identidade;

σ_a^2 é a variância genética aditiva direta;

σ_p^2 é a variância de ambiente permanente e σ_e^2 refere-se à variância residual.

O modelo de limiar para dados categóricos assume a existência de um conjunto de limiares ordenados $\tau_0 = -\infty < \tau_1 < \tau_2 < \dots < \tau_{c-1} < \tau_c = \infty$ para a característica e uma variável subjacente para cada animal i , τ é o número dos escores de cada categoria. Toma-se como exemplo a categoria (c_2): Uma vez que a característica é avaliada para cada animal ($i = \{1, 2, \dots, n\}$) por meio da atribuição de escores (c) 1 e 2, existem $c + 1 = 3$ limiares (*thresholds*) na escala latente, de forma que, $\tau_{min} < \tau_1 < \tau_2 < \tau_{max}$. Pode-se definir como limiares mínimos e máximos: $\tau_0 = \tau_{min}$ e $\tau_c = \tau_{max}$, sendo que $c - 1$ limiares restantes podem assumir qualquer valor entre τ_{min} e τ_{max} . Quando a variável latente para o animal i está entre os limiares τ_{c-1} e τ_c , o fenótipo categórico y_i para o animal i toma o valor c (SORENSEN e GIANOLA, 2002).

A herdabilidade para a característica foi obtida pela divisão da variância genética aditiva pela variância fenotípica. Assim, tendo-se os dados (y), conhecendo o valor da herdabilidade para a característica e preenchendo as

matrizes X, Z, e A, pode-se prever o valor genético (α) dos animais pelo modelo animal.

Preditos dessa forma, os parâmetros e valores genéticos dos animais foram obtidos com máxima precisão, estimados de forma tradicional, utilizando as informações dos próprios animais (dados fenotípicos) e também de seus parentes (pedigree).

6.3 Resultados e Discussões

Dos 652 bovinos Hereford avaliados frente ao surto de CIB nos anos de 2016 e 2017, 367 adoeceram, representando uma prevalência média de 56%. O número de animais diagnosticados com diferentes escores de severidades de lesão para CIB em cada uma das quatro avaliações para olho direito, olho esquerdo e ambos os olhos, estão descritos na Tabela 12. A porcentagem de animais apresentando cada um dos escores de lesão ocular na quarta e última avaliação foi de 58; 15; 19; 4,7; 1,5% para olho esquerdo e 61; 14; 17; 5 e 1,8% para olho direito para os escores 0, 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Os resultados de elevada prevalência a CIB do período pós desmame dos animais foram similares com os encontrados em um estudo prévio com animais da raça Hereford (WARD e NIELSON, 1979).

Tabela 12: Número de animais diagnosticados com diferentes escores de severidades de lesão para CIB em cada uma das quatro avaliações.

Primeira avaliação							Segunda avaliação						
OE							OE						
OD	0	1	2	3	4	Total	OD	0	1	2	3	4	Total
0	405	28	24	4	9	470	0	349	36	15	6	4	410
1	24	68	16	4	2	114	1	23	68	22	2	6	121
2	14	11	20	2	2	49	2	16	10	20	5	0	51
3	1	2	1	0	0	4	3	3	6	8	0	2	19
4	5	0	6	2	2	15	4	4	0	2	3	2	11
Total	449	109	67	12	15	652	Total	395	120	67	16	14	612

Terceira avaliação							Quarta avaliação						
OE							OE						
OD	0	1	2	3	4	Total	OD	0	1	2	3	4	Total
0	347	33	26	8	5	419	0	285	28	56	16	5	390
1	22	41	11	3	0	77	1	16	49	18	6	1	90
2	19	12	40	8	1	80	2	51	20	35	4	1	111
3	8	3	6	3	1	21	3	14	3	12	3	1	33
4	2	0	4	0	0	6	4	6	0	4	1	1	12
Total	398	89	87	22	7	603	Total	372	100	125	30	9	636

OD = Olho direito / OE = Olho esquerdo

A distribuição dos escores para CIB, agrupados em duas, três e nove categorias, pode ser vista na Tabela 13. A taxa de animais sadios, de um dos olhos afetados e ambos os olhos afetados, na quarta avaliação foi de 44, 30, 25% respectivamente. A porcentagem de animais apresentando cada um dos escores por animal para a categoria c_9 variou de 0,15% a 24%.

Tabela 13: Número de animais diagnosticados com diferentes graus de CIB, classificados em duas, três e nove categorias.

Primeira avaliação										Segunda avaliação									
Escore por animal para cada uma das categorias – CIB										Escore por animal para cada uma das categorias – CIB									
Cat.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Cat.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
c_2	405	247	-	-	-	-	-	-	-	c_2	349	264	-	-	-	-	-	-	-
c_3	405	109	138	-	-	-	-	-	-	c_3	349	107	157	-	-	-	-	-	-
c_9	405	52	106	32	40	5	8	2	2	c_9	349	59	99	41	36	20	2	5	2

Terceira avaliação										Quarta avaliação									
Escore por animal para cada uma das categorias – CIB										Escore por animal para cada uma das categorias – CIB									
Cat.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Cat.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
c_2	347	256	-	-	-	-	-	-	-	c_2	285	351	-	-	-	-	-	-	-
c_3	347	123	133	-	-	-	-	-	-	c_3	285	192	159	-	-	-	-	-	-
c_9	347	55	86	39	53	14	8	1	0	c_9	285	44	156	68	55	17	8	2	1

OD = Olho direito / OE = Olho esquerdo

Cat. = Categoria

CIB = ceratoconjuntivite infecciosa bovina

Estes resultados são muito semelhantes aos encontrados por Snowden et al. (2005), no qual estudaram a influência dos efeitos genéticos e ambientais na incidência de CIB em nove raças de bovinos, incluindo a Hereford. Neste trabalho anterior foi encontrada uma diferença significativa na prevalência de CIB em Hereford (22,4%), sendo mais suscetível a enfermidade em questão, em comparação com outras raças (Simmental 7,6%, Charolês 6,5%, Angus 3,7%, Limousin 3,4%). Com isso, pode-se supor que existem variações genéticas para resistência à CIB entre raças, o que deve ser considerado no momento da seleção. Uma alternativa simples e viável para reduzir a incidência da doença no rebanho é selecionar animais sadios e descartar do rebanho os animais acometidos por CIB.

A correlação entre pigmentação ocular e susceptibilidade a CIB foi de -0,15 para o olho direito e -0,20 para o olho esquerdo. Apesar de esta correlação ser

fraca, alguns autores relatam a maior prevalência de CIB na ausência de pigmentação ocular em animais da raça Hereford (SNOWDER et al. 2005). Frisch (1975) associou a gravidade da lesão causada por CIB com o grau de pigmentação ocular em animais Hereford e Brahman, na qual diferenças significativas foram encontradas entre as raças, sendo que o Hereford sofreu maiores taxas de incidência e gravidade à CIB devido à baixa pigmentação ocular. A seleção de animais para pigmentação ocular vem sendo empregada em programas de melhoramento genético (CARDOSO & LOPA, 2010). O coeficiente de correlação é um parâmetro importante, pois estabelece a força do relacionamento de uma característica em relação à outra, podendo ser positiva (aumento das duas variáveis) ou negativa (quando ocorreu o acréscimo de uma e decréscimo de outra) (STEEL e TORRIE, 1980).

As estimativas de componentes de variâncias e das herdabilidade e para as categorias em estudo encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14: Média a posteriori para variâncias genética aditiva direta (σ_a^2), de ambiente permanente (σ_p^2) e residual (σ_e^2), e herdabilidades direta (h^2) para as categorias (c_2, c_3, c_9) para incidência a CIB.

Categoria	Variâncias			Herdabilidade
	σ_a^2		σ_e^2	h^2
c_2	0,259	0,530	1,002	0,14
c_3	0,174	0,535	1,090	0,096
c_9	0,110	0,378	0,614	0,099

DP= desvio padrão

Foram observadas estimativas de herdabilidade direta para a incidência de CIB de 0,14, 0,096 e 0,099 para os modelos levando em conta duas, três ou nove categorias (c_2, c_3 e c_9) respectivamente. A herdabilidade para os modelos com três ou nove categorias (c_3 e c_9) foram muito parecidas, no entanto, se mostraram inferiores à herdabilidade para a categoria c_2. Ou seja, o que deve-se levar em conta no momento da seleção, é selecionar animais pela presença ou ausência de enfermidade (CIB) e não pela gravidade de lesão ocular.

Há poucos estudos na literatura que relatem os índices de herdabilidade para a característica em questão, para bovinos Hereford. As estimativas de herdabilidade foram menores do que aquelas encontradas por Snowden et al. (2005), os quais examinaram em um grande conjunto de dados, com registro para incidência de CIB em bovinos de raças diversas, ao longo de 20 anos (1983 a 2003). Neste trabalho anterior a estimativa de herdabilidade para a característica

na raça Hereford foi de 0,28 (SNOWDER et al., 2005). No entanto, Ali et al. (2012) avaliaram 1583 bovinos (50% Hereford e 50% Shorthorn) frente a surtos de CIB. Encontraram estimativas de herdabilidade para CIB em torno de 0,17 a 0,19 para bovinos nas fases de pré-desmame e pós-desmame, respectivamente. Kizilkaya et al., (2013) relataram estimativas de herdabilidade para a característica em questão em torno de 0,10 a 0,25. Esses autores avaliaram 860 animais da raça Angus, pertencentes à Universidade de Iowa-Estados Unidos, durante surtos de CIB entre os anos de 2004 a 2008.

Como a estimativa de herdabilidade apresentou-se maior na categoria c_2 (Tabela 14), optou-se por trabalhar apenas com essa categoria, uma vez que a herdabilidade reflete a proporção da variação fenotípica que poderá ser herdada, ou seja, quantifica a confiabilidade do valor fenotípico como guia para o valor genético (ROSSMANN, 2001).

As distribuições dos valores genéticos preditos (EBVs, do inglês *expected breeding value*) para a categoria c_2 encontram-se na Figura 10. Os EBVs variam entre -0,56 a 0,64. Os valores extremos da distribuição nos mostra que existe uma grande variabilidade na resistência ou na susceptibilidade dos animais frente à CIB. Em um programa de melhoramento genético onde se prioriza a escolha de animais resistentes a CIB, indivíduos com menores EBV (extrema esquerda do gráfico) para CIB seriam candidatos desejáveis para a seleção.

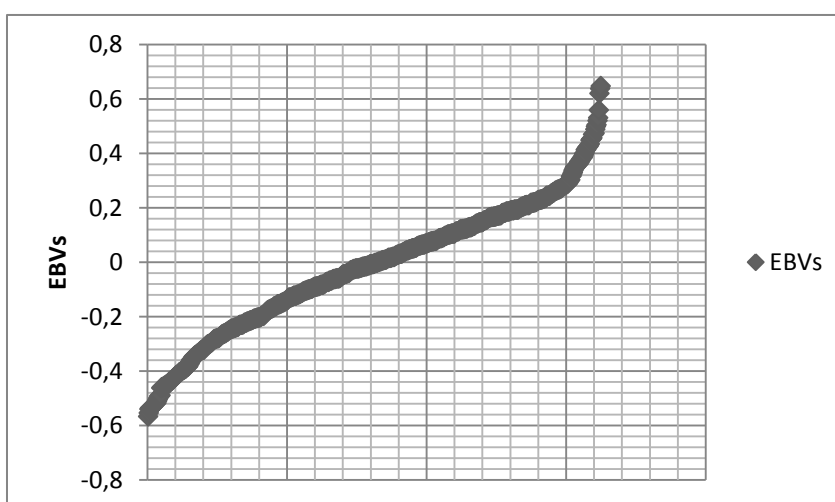


Figura 10: Distribuição dos valores genéticos preditos (EBVs) para susceptibilidade à CIB, para os animais classificados na categoria c_2.

6.4 Conclusões

A correlação entre pigmentação ocular e presença ou gravidade das lesões foi fraca. Dada à importância da pigmentação ocular em bovinos da raça Hereford, sugerem-se maiores investigações sobre a importância de selecionar animais com pigmentação ocular como uma alternativa para reduzir a incidência da ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

A susceptibilidade a ceratoconjuntivite infecciosa bovina é uma característica hereditária, embora sua herdabilidade seja baixa em animais sobreano da raça Hereford. O valor dessas estimativas sugere que a seleção genética por animais resistentes a esta enfermidade é possível.

Referências

- ALI, A. A.; NEILL, C. J. O.; THOMSON, P. C.; KADARMIDEEN, H. N. Genetic parameters of infectious bovine keratoconjunctivitis and its relationship with weight and parasite infestations in Australian tropical Bos taurus cattle. **Genetics Selection Evolution**, 44(22), 2012.
- CAMPOS, L. PROMEBO® – Programa de Melhoramento de Bovinos de Carne. In: **Curso de Melhoramento da Raça Aberdeen Angus – Formação de Avaliadores PROMEBO/ANGUS**, 5., 2011, Porto Alegre. p.2-15, 2011.
- CARDOSO, F. F.; LOPA, T. P.; **Pampa Plus: Avaliação Genética Hereford e Braford**, Bagé, EMBRAPA – Pecuária Sul, 2010, 55p.
- CARNEIRO, J. M.; EUCLYDES, R. F.; LOPES, P. S. Avaliação de métodos de estimação de componentes de variância utilizando dados simulados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 328-336, 2004.
- CHANDLER, R. L.; BAPTISTA, P. J. H. P.; TURFREY, B. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, p. 441-448, 1979.
- EUCLIDES FILHO, K. **Melhoramento genético animal no Brasil: fundamentos, história e importância**. Campo Grande, MS: Embrapa, Documentos 75, 1999. 63p.
- FARIA, C. U. et al. Inferência bayesiana e sua aplicação na avaliação genética de bovinos da raça nelore: revisão bibliográfica. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 1, p. 75-86, 2007.
- FRISCH, J. E. The relative incidence and effect of bovine infectious keratoconjunctivitis in bos indicus and bos taurus cattle. **Animal Production**, v. 21, p. 265-274, 1975.
- GASPAR, E. B. et al. Guia de Coleta de Dados de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CBI). **Documento técnico - ISSN 1982-5390** - Embrapa Pecuária Sul – Bagé. 2015.
- KENNEDY, B. W. Bias and mean square error from ignoring genetic group in mixed model sire evaluation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, p. 689-697, 1981.
- KIZILKAYA, K. et al. Genome-wide association study of infectious bovine keratoconjunctivitis in Angus cattle. **BMC Genetics**, v. 14, n. 23, 2013.
- KODJO, A.; EXBRAYAT, P.; RICHARD, Y. Identification of *Moraxella bovis* and related species from calves with IBK and goats by qualitative genetic transformation assay. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, p. 336-343, 1994.
- MARRION, R. M.; RILEY, L. K. Detection of cell detachment activity induced by *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 9, p. 1145-1149, 2000.
- MISZTAL, S. et al. **Blupf90 and related programs (BGF90)**. Proc. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, 2002.

NIETO, L. M.; ALENCAR, M. M.; ROSA, A. N. Critérios de seleção. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 109-122.

POSTMA, G.C.; CARFAGNINI, J. C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 81, p. 449-458, Nov. 2008.

RESENDE, M. D. V.; PEREZ, J. R. H. R. Melhoramento animal: predição de valores genéticos pelo modelo animal – BLUP em bovinos de leite, bovinos de corte, ovinos e suínos. **Archives of Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 17-29, 1999.

ROSSMANN, H. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2001.

SHRYOCK, T. R.; WHITE, D. W.; WERNER, C. S. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 305-309, 1998.

SLATTER, D. H. et al. A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p. 65-72, 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, p. 507–518, 2005.

SORENSEN, D. A.; GIANOLA, D. **Likelihood, Bayesian and MCMC methods in Quantitative Genetics**. New York: Springer-Verlag, New York, Inc, 2002.

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

TSURUTA, S.; MISZTAL, I. **Thrgibbs1f90 for estimation of variance components with threshold-linear models**. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. **Anais...**2006

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

WILCOX, G. E. The etiology of infectious bovine keratoconjunctivitis in Queensland. 1. *Moraxella bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 46, p. 409-414, 1970.

7 Capítulo 4 – Estudo de associação genômica ampla (GWAS) para susceptibilidade à Ceratoconjuntivite Infecciosa bovina

7.1 Introdução

A raça de bovinos de corte Hereford destaca-se das demais raças devido ao seu potencial na produção de carne com textura, maciez e sabor diferenciados. Esta raça está amplamente distribuída nos rebanhos mundiais, sendo uma das três raças mais relevantes de bovinos de corte (WILCOX, 1970). Por outro lado, a raça Hereford é a mais susceptível frente às doenças oculares, entre elas, a ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) (SNOWDER et al., 2005). A CIB é uma infecção bacteriana altamente contagiosa, que afeta a conjuntiva de bovinos de todas as faixas etárias, porém, animais jovens são geralmente mais acometidos (KILLINGER, 1977).

Métodos tradicionais de avaliação genética se baseiam no fenótipo e pedigree dos animais. Mais recentemente, os avanços ocorridos na área da biologia molecular possibilitaram a genotipagem, proporcionando o uso das informações genômicas na seleção de animais pelos programas de melhoramento genético. O sequenciamento completo do genoma bovino (ELSIK, et al., 2009) e o desenvolvimento de plataformas de genotipagem de SNPs em alta densidade ao longo de todo genoma (MATUKUMALLI et al., 2009; ILLUMINA, 2011; AFFYMETRIX, 2011) possibilitaram verificar a variação genética que influencia a manifestação de características de interesse econômico em bovinos por meio dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS) (PAUSCH et al., 2012; HUSON et al., 2014).

Nos últimos anos os custos para genotipagem reduziram drasticamente, porém a genotipagem de todos os animais candidatos a seleção com painéis de marcadores SNP de alta densidade ainda é uma prática financeiramente inexecutável (BOISON et al., 2015). Uma estratégia viável para se reduzir estes custos de genotipagem por indivíduo e, consecutivamente, aumentar a acurácia das estimativas e a eficiência da seleção genômica, é a utilização de imputação de genótipos (BOICHARD et al., 2012; HUANG et al., 2012; KHATKAR et al., 2012; CARVALHEIRO et al., 2014).

A imputação de genótipos é a predição de marcadores faltantes ou desconhecidos que não foram genotipados em uma amostra de indivíduos em uma

população específica. Como exemplo: a genotipagem de fêmeas jovens com chip de baixa densidade (3K, 6K, ou outras densidades), com posterior imputação para 50K ou *HD (high density) bead chip* (777 mil SNPs). A imputação de genótipos pode ser uma alternativa a ser usada para aumentar o número de marcadores que poderão ser utilizados nos GWAS (MARCHINI e HOWIE, 2010). Nesse contexto, diversos estudos de GWAS em bovinos de corte têm sido conduzidos com genótipos imputados (BARENDSE, 2011; CHEN et al., 2012; SANTANA et al., 2014a, SANTANA et al., 2014b).

O GWAS utiliza uma grande quantidade de marcadores espalhados ao longo de todo o genoma para mapear associações entre regiões cromossômicas e os fenótipos de interesse, pressupondo que uma determinada mutação relacionada à expressão da característica esteja fortemente (desequilíbrio de ligação) ligada com alguns marcadores (MENEZES et al., 2013). Significativas associações genéticas para características de importância econômica dentro da produção de bovinos têm sido relatadas, incluindo a resistência à CIB em Angus (KIZILKAYA et al., 2013). Desta forma a realização de GWAS torna-se desejável a fim de identificar marcadores genéticos e possibilitar a seleção mais acurada para esta característica em bovinos da raça Hereford.

Diante da importância da aplicação e da exploração das novas tecnologias disponíveis, o presente trabalho teve como objetivo final a realização de um estudo de associação ampla do genoma (GWAS) para identificação de regiões genômicas e SNPs mais representativos para susceptibilidade à Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB) na raça Hereford.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Dados fenotípicos

Os dados fenotípicos utilizados neste trabalho são provenientes de animais da raça Hereford pertencentes a quatro fazendas vinculadas ao programa de melhoramento genético da associação de criadores Conexão Delta G e de rebanhos do Pampa Plus da ABHB, nascidos no ano de 2015 e criados no Rio Grande do Sul. Foram utilizados dados de fenótipo para a susceptibilidade à CIB. A avaliação desta característica foi realizada mediante a atribuição de escores para lesão ocular, considerando uma escala de 0 a 4 (Tabela 11), conforme descrito mais detalhadamente no capítulo anterior.

7.2.2 Dados genômicos

Pelo ou sangue foram coletados dos 648 animais avaliados fenotipicamente, para servirem como fonte de DNA. Estas amostras foram enviadas para extração de DNA e genotipagem, que foi realizada por empresa prestadora de serviços. Todos os animais foram genotipados por meio da tecnologia Illumina®, em *chips* que compreendem 30.106 SNPs (30K) (*GGP-LD BeadChip*®).

7.2.2.1 Controle de qualidade dos dados genômicos e amostras

As análises de controle de qualidade têm como objetivo a manutenção da integridade dos marcadores e amostras à serem testadas. Para tanto, as análises de controle de qualidade em nível de marcadores e amostras, rotinas foram desenvolvidas no programa R versão 3.4.1 (R Core Team, 2017) utilizando o pacote *snpStats* (CLAYTON, 2015).

Entre os critérios e os limiares de exclusão dos SNPs, considerou-se:

- 1) *Eficiência de Genotipagem (Call Rate)*: Foram removidos SNP com call rate < 0,98 objetivando eliminar SNP com baixa qualidade de genotipagem (TURNER et al., 2011).
- 2) *Minor Allele Frequency (MAF)*: em que a frequência mínima dos SNPs (<3%) é identificada. A Frequência do alelo menor refere-se à frequência na qual o alelo menos comum ocorre em uma população, ou seja, muito poucas observações se têm sobre esses alelos.
- 3) *SNP que desviam do EHW*: foram excluídos os SNPs que apresentaram desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), ou seja, SNPs com frequências alélicas $P > 10^{-7}$ são excluídas.
- 4) *SNPs altamente correlacionados*: Avaliou-se a correlação entre SNPs dentro de uma janela de 100 marcadores, sendo excluído das análises um SNP de cada par altamente correlacionado ($r > 0,98$).
- 5) *SNP com a mesma coordenada genômica*: excluiu-se das análises marcadores que se apresentavam com localização idêntica no genoma.

Para amostras, os critérios e limites para exclusão das mesmas foram: Call rate (<90%); desvio de heterozigosidade (acima de três desvios padrões em relação à média); possíveis amostras duplicadas (genótipos idênticos >98%), erros de identificação de sexo.

Após controle de qualidade (CQ), 24.858 marcadores SNPs (82,5%), bem como 632 (97,5%) amostras foram selecionadas para posteriores análises GWAS.

7.2.2.2 Imputação de genótipos

Com o intuito de aumentar a densidade de marcadores, uma análise de imputação foi realizada para combinar as informações dos 632 animais (24.858 SNPs) com as informações disponíveis de 3728 animais genotipados com o BovineSNP50, previamente submetidos ao controle de qualidade (39.922 SNPs), por meio do *software* FImpute v.2.2. (SARGOLZAEI et al., 2014). Após análises de FImpute 100% dos genótipos foram imputados corretamente, sendo assim, 39.922 marcadores foram utilizados nas análises de GWAS.

7.2.3 Estudos de associação ampla do genoma

Os valores genéticos preditos (EBV) descritos no capítulo anterior, obtidos utilizando modelo limiar (*threshold*) e componentes de variância preditos a partir do conjunto de dados em questão foram derregredidos (DEBV) (GARRICK et al.2009). As associações entre os marcadores moleculares e as informações fenotípicas (DEBVs) foram realizadas utilizando um modelo misto sob as metodologias Bayes B (MEUWISSEN et al., 2001) e Bayes C π (HABIER et al., 2011), no *software* Gensel versão 4.0 (FERNANDO e GARRICK, 2009).

A distribuição de π a priori utilizada em Bayes B foi estimada por meio da metodologia Bayes C π (valor de π = a proporção de SNPs com efeito nulo), assumindo o valor de π a priori de 0,5.

Por meio do método Bayes B, assumindo π de 0,99 (assume-se que 99% dos marcadores utilizados na análise não possuem efeito sobre a característica), foi realizado o GWAS para a susceptibilidade à CIB, com o objetivo de identificar os marcadores e janelas de maior efeito sobre a característica. Foi realizado um total de 50.000 iterações, sendo que as 5000 primeiras foram descartadas no *burn-in*. O método Bayes B pode ser representado pelo seguinte modelo estatístico:

$$y = \sum_{i=1}^{k=39.922} z_i a_i + e$$

Em que: y é o vetor dos valores de DEBVs (fenótipos); k é o número total de marcadores (SNPs); z_i é o vetor de genótipos de um marcador i , codificado como

AA = -10, AB = 0 e BB = 10; a_i é o efeito de substituição aleatória do marcador i com sua própria variância; σ_{ai}^2 , é uma variável aleatória 0/1 que indica a ausência (com probabilidade π) ou presença (com probabilidade $1 - \pi$) de SNP i no modelo e e é um vetor de resíduos aleatórios assumido com distribuição normal.

Janelas compostas por múltiplos marcadores detectam melhor a variabilidade de determinada região cromossômica (SAATCHI et al., 2012), por tanto, a associação entre as regiões genômicas e as características fenotípicas foram avaliadas utilizando 2530 janelas de uma megabase (Mb), incluindo número variável de marcadores (ordenados conforme genoma bovino UMD 3. 1.) e com diferentes magnitudes de efeito.

Para a detecção de SNPs mais informativos frente à característica em questão foram desenvolvidos scripts no *software* R versão 3.4.1 (R Core Team, 2017) (SOLLERO et al., 2017), em que primeiramente selecionou-se janelas responsáveis pela maior proporção da variância genética para a característica, de acordo com Onteru et al. (2012). Janelas que apresentaram porcentagem de variância genética superior a cinco vezes a variância genética média esperada para cada janela ($100\%/2.530*5=0,2\%$) foram selecionadas. Portanto, janelas que apresentaram variância genética superior a 0,2% foram consideradas como regiões potencialmente associadas à QTLs (*Quantitative Trait Locus*).

7.2.4 Análise de enriquecimento funcional

As janelas genômicas que explicaram pelo menos 0,2% da variância genética foram consideradas como regiões com efeito importante, tendo maior probabilidade de estarem associadas com regiões QTLs na característica estudada. Essas regiões encontradas foram exploradas no que diz respeito a sua localização para procura de genes candidatos por meio do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e *Ensembl* (Entrez IDs, Ensembl gene ID, HGNC symbols e mais) (CUNNINGHAM et al., 2015). Os principais genes associados à susceptibilidade a CIB, com base na literatura, tiveram suas funções descritas. Para as análises de enriquecimento funcional, os termos MeSH (Medical Subject Headings) foram detectados por meio do pacote MESHR (TSUYUZAKI et al., 2015) do *software* R (R CORE TEAM, 2017), e tiveram sua funcionalidade verificada nas categorias: Anatomia, organismos, doenças e fenômenos e processos.

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Estudo de associação genômica ampla (GWAS)

O GWAS utilizando todos os 39.922 SNPs pelo método Bayes B ($\pi=0,99$), permitiu construir um total de 2530 janelas. Dessas, os resultados apontaram sete regiões (janelas de 1Mb) significativas nos cromossomos BTA (*Bos taurus* (BTA) chromosome) 3, 11, 14, 18, 26 e 27. Cada uma destas janelas explicou mais de 0,20% da variância genética para a característica em estudo (CIB) (Tabela 15). O número de marcadores encontrados dentro de cada janela variou de 16 a 25 SNPs. O total de marcadores identificados entre as janelas mais informativas ($>0,20\%$) foi 133. A janela de maior representatividade para CIB foi a 1226, localizada no cromossomo BTA 11, contendo 20 marcadores, que explicaram 1,46% da variância genética para a característica (Tabela 15).

As estimativas obtidas para cada janela de SNPs associada com a susceptibilidade à CIB, localização e número total de SNPs abrangidos encontram-se na Tabela 15. O percentual de variância explicada para cada janela de 1Mb por meio do genoma foram apresentados em gráficos do tipo *Manhattan plot* (Figura 11).

O top SNP (Top_SNP_Name) de cada uma das janelas que explicaram maiores proporções de variância genética (potencial QTL) foram selecionados por meio dos parâmetros Model Frequency (ModelFreq) e t.like (Tabela 15). O parâmetro de ModelFreq é considerado uma importante ferramenta para selecionar marcadores, pois representa a proporção de cadeias que incluíram determinado marcador no modelo (Yi et al., 2005). Além do ModelFreq, o valor de t.like também pode ser utilizado para distinguir marcadores informativos. Este parâmetro é definido pela razão do efeito a posteriori do marcador, dividido pelo desvio padrão das distribuições destes efeitos (FERNANDO e GARRICK, 2009).

Em um GWAS para a susceptibilidade à CIB em bovinos da raça Angus (KIZILKAYA et al., 2013) foram relatados vários SNP altamente significativos localizados em cinco janelas associadas à característica nos cromossomos 2, 12, 13, 21. Casas e Stone (2006) relataram a presença de QTL para a tolerância à CIB em bovinos mestiços, no cromossomo 1 e 20. Ainda, Casas e Snowden (2008) indicaram que a região no cromossomo 20 pode estar associada à resistência geral a doenças bacterianas (incluindo CIB).

Tabela 15: Descrição das janelas genômicas que explicam pelo menos 0,20% da variância genética total para a susceptibilidade a CIB em bovinos da raça Hereford.

Window	Chr	SNP _i	SNP _f	Posição _i	Posição _f	N_SNP	%Var	Top_SNP_Name	ModelFreq	t.like
1226	11	BTB-01593930	Hapmap22876-BTA-155681	68565	980080	20	1.46	ARS-BFGL-NGS-20788	0.2765	0.942
309	3	ARS-BFGL-NGS-27948	ARS-BFGL-NGS-40088	10000411	10916641	16	0.65	ARS-BFGL-NGS-25382	0.1653	0.904
2381	18	Hapmap32355-BTA-154136	ARS-BFGL-NGS-114894	4146848	4986492	19	0.47	BTB-01617999	0.1268	0.876
1840	26	ARS-BFGL-NGS-34118	Hapmap24386-BTA-163519	48042552	48971298	16	0.44	ARS-BFGL-NGS-34118	0.1275	0.885
1521	14	Hapmap25468-BTC-063927	ARS-BFGL-NGS-76832	12005796	12934396	25	0.34	ARS-BFGL-NGS-20645	0.0909	0.861
1229	11	ARS-BFGL-NGS-31804	ARS-BFGL-NGS-18450	3044180	3971531	20	0.23	ARS-BFGL-NGS-69066	0.0816	0.858
2420	27	Hapmap42802-BTA-109751	ARS-BFGL-NGS-9378	35024154	35985713	17	0.23	ARS-BFGL-NGS-110790	0.0767	0.848

SNP_i= SNP presente no início da janela genômica; SNP_f= SNP presente no final da janela genômica; Posição_i= posição (em pares de base) do início da janela genômica; Posição_f= posição (em pares de base) do final da janela genômica; N_SNP= Números de SNPs presentes na janela genômica e %Var= Proporção de variância genética para incidência a CIB explicada pela janela genômica; Top_SNP_Name= nome do SNP *top* da janela genômica (em termos de ModelFreq e t.like).

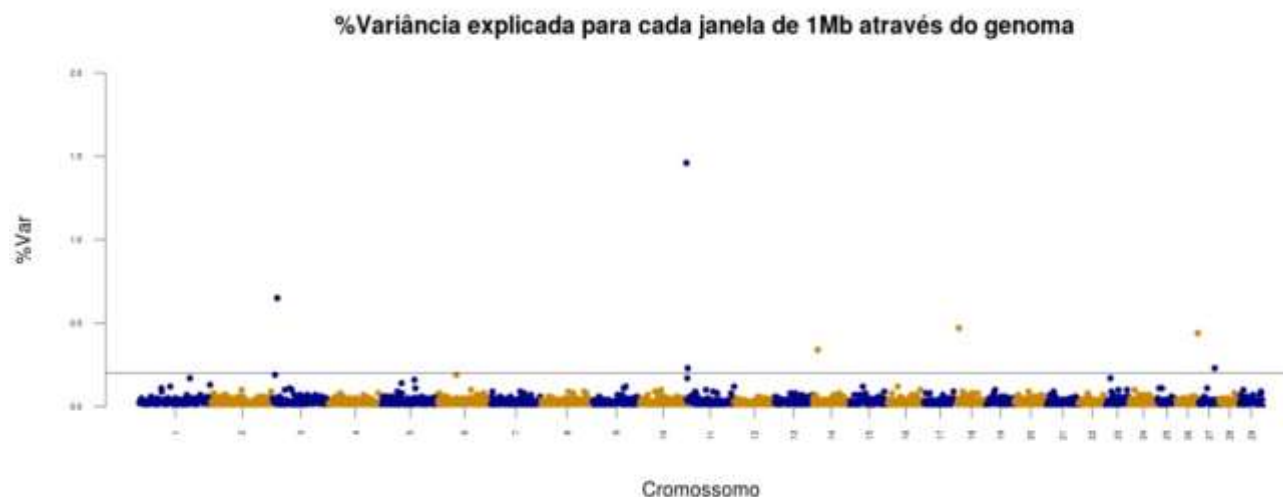


Figura 11: Gráfico de *Manhattan* com os resultados para o estudo de associação ampla do genoma realizado pelo método Bayes B ($\pi=0.99$) para a susceptibilidade a CIB.

Vale ressaltar que as regiões detectadas neste trabalho são inéditas para a susceptibilidade à CIB, ou seja, não há regiões significativas condizentes com os QTLs relatados em estudos anteriores para incidência CIB (CASAS e STONE, 2006; CASAS e SNOWDER, 2008; KIZILKAYA et al., 2013). A diferença pode se dar em parte devido às diferenças de metodologia empregadas nos estudos (uma única raça de animais - Hereford) e o estudo anterior (touro *Bos Taurus* x *Bos indicus* acasalados com vacas de múltiplas raças) ou ainda devido ao pequeno número de amostras analisadas. Essas diferenças entre os resultados podem indicar diferentes caminhos metabólicos ou diferentes QTL segregantes (dentro da raça versus outras raças) para a ocorrência de CIB.

7.3.2 Análise de enriquecimento funcional utilizando os termos MeSH

Após a correção para múltiplos testes realizada pelo procedimento de Benjamini e Hochberg ($p < 0,05$) as análises de enriquecimento funcional utilizando MeSH revelaram oito termos significativos considerando a lista de genes identificada a partir dos marcadores selecionados (Tabela 16). Dois destes termos (D017949- *retinal cone photoreceptor cells* e D001770- *Blood Bactericidal Activity*) foram discutidos neste trabalho por apresentarem-se mais relacionados à susceptibilidade a CIB.

O termo *retinal cone photoreceptor cells* (células fotorreceptoras do cone retinal) tem associação importante na captação de luz pelo sistema visual. Estas células convertem a luz em impulsos elétricos enviados ao córtex cerebral responsável pela visão, no qual a sensação de visão ocorre (LEITE et al., 2013). Segundo Conceição e Turnes (2003) um dos fatores pré disponentes para o acometimento por ceratoconjuntivite em bovinos é o aumento do foto período, ou seja, maior incidência de raios UV sobre a retina dos animais. Como consequência, há uma predisposição à proliferação da bactéria *Moraxella bovis* (tendo como principal agente transmissor as moscas) causadora de CIB.

O *blood bactericidal activity* (atividade bactericida do sangue) refere-se à propriedade bactericida natural do sangue. Os primeiros sinais clínicos da CIB são desencadeados pela aderência da bactéria *Moraxella bovis* na conjuntiva do bovino. Citotoxinas com atividade enzimática provocam lesões na córnea beneficiando a colonização por bactérias (ARAÚJO e RICCIARDI, 1988). A lise celular estimula um processo inflamatório que gera um edema de córnea e provoca migração de células

inflamatórias (GIL TURNES, 2001). Os neutrófilos são células sanguíneas que fazem parte do sistema imunológico dos animais. Os neutrófilos são capazes de fagocitar, degradam os fatores de virulência das bactérias, evitando assim a propagação dessas e garante uma alta concentração local de agentes antimicrobianos do sangue para a inibição das bactérias envolvidas na CIB.

Tabela 16: Termos MeSH relacionados com a susceptibilidade a CIB em bovinos Hereford com seus devidos *p-values* ($p < 0,05$).

MeSH_ID	MeSH_Name	Nº total de genes	Genes Significativos	Gene Symbol	p_value
D001403	Babesia	1	1	ACKR1	0,0023
D010966	Plasmodium vivax	1	1	ACKR1	0,0023
D001404	Babesiosis	1	1	ACKR1	0,0023
D001770	Blood Bactericidal Activity	6	1	CRP	0,014
D017949	Retinal Cone photoreceptor cells	13	1	CNGA3	0,030
D000824	Animal Nutritional Physiological Phenomena	13	1	CRP	0,030
D019556	COS cells	147	2	SFRP1 ,MGAT4A	0,045
D024506	5 Flanking Region	22	1	ACKR1	0,050

7.3.3 Genes candidatos

As regiões genômicas pré-selecionadas, contendo os 133 SNPs mais informativos, foram consideradas como regiões de efeito importante para a característica estudada.

Duas janelas genômicas (1226 e 1229) apresentaram efeito significativo para a susceptibilidade a CIB no cromossomo BTA11, explicando 1,46% e 0,23% da variância genética. Os genes *CNGA3* e *MGAT4A* respectivamente estão localizados nestas regiões genômicas. O cromossomo 11 já foi previamente associado à característica pigmentação ocular na raça Fleckvieh (Pausch et al., 2012). A ausência de pigmentação ocular pode desencadear uma irritação ocular, causada pela irradiação solar, e com isso há uma predisposição para a instalação da bactéria *Moraxella bovis* na conjuntiva, causando assim a enfermidade CIB (WARD e NIELSON, 1979). O gene *CNGA3* é um dos seis fotorreceptores pertencentes ao canal CNG do cone retinal (DAI et al., 2013). Esse canal é conhecido pela sua contribuição essencial para a fototransdução cônica (WISSINGER et al., 2001). A proteína codificada pelo gene *MGAT4A* [Mannosyl (Alpha-1,3-) -Glycoprotein Beta-1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase, Isozyme A] possui forte influência na metabolização de carboidratos, no processo de diferenciação celular e da oncogênese (SILVEIRA, 2008). O BTA11 merece atenção, pois apresenta marcadores significativos associados a outro grave problema no qual repercute na economia de pecuária de corte brasileira, como reportado por Sollero et al. (2015), estudando animais das raças Hereford e Braford, associaram alguns cromossomos, entre eles o BTA11, com os SNPs mais significativos para a característica de resistência a carrapatos em bovinos.

A janela genômica 309 no cromossomo BTA3 explicou 0,65% da variância genética para a característica em questão, na qual foram identificados dois genes que potencialmente influenciam as vias ou processos imunológicos: *ACKR1* e *CRP*. O receptor atípico de quimiocinas 1 (*ACKR1- Atypical chemokine receptor 1*), mais conhecido como antígeno do grupo sanguíneo DARC, são capazes de regular as respostas imunes e inflamatórias de várias maneiras inclusive como receptores que atraem as quimiocinas e realizam a degradação das mesmas (MANTOVANI et al., 2001). Já o gene *CRP* (C – Reactive protein), pertence ao grupo dos reguladores de proteínas de sinalização. Durante infecções e condições estressantes, os

macrófagos secretam citocinas que estimulam o fígado a sintetizar rapidamente grandes quantidades de *CRP* (*C-reactive protein*) (LEE et al., 2003). A proteína CRP desempenha um papel importante na destruição de agentes infecciosos, minimizando os danos nos tecidos, facilitando a reparação e regeneração de tecidos (SARIKAPUTI et al., 1991; HORADAGODA et al., 1999). Em estudos realizados por Schrodler et al. (1995) os níveis de CRP em vacas com mastite foram muito maiores do que os de vacas saudáveis. Os genes *ACKR1* e *CRP* estão associados ao sistema imunológico dos bovinos, tornando-se genes candidatos à susceptibilidade a CIB.

No cromossomo BTA18, uma janela genômica 1840 foi identificada, a qual explicou 0,47% da variância genética. A janela genômica 2381 associada ao cromossomo BTA26, explicou 0,44% da variância genética. No cromossomo BTA14, a janela genômica 1521 identificada explicou 0,34% da variância genética. Essas três janelas genômicas não foram associadas a genes potencialmente relacionados à susceptibilidade a CIB. Entretanto, esses três cromossomos estão associados a outras importantes características produtivas e doenças que afetam diretamente o sistema de produção de bovinos de corte (WEIMER et al., 2007; MARQUES et al., 2009; ZANELLA et al., 2011; OLIVIERI, 2015; CARDOSO, 2016).

No cromossomo BTA27, a janela genômica 2420 de maior efeito para a característica em questão, explicando 0,23% da variância genética, na qual foi encontrado o gene *SFRP1*. O gene *SFRP1* pertence à família das *SFRPs* (*Secreted frizzled-related protein*), que são reguladores extracelulares da via canônica de sinalização Wnt (proliferação celular e formação de tecidos) (DESCAMPS et al., 2008), atuando na inibição desta via de sinalização na fase de formação das células musculares embrionárias (mioblastos) (AKIMOTO et al., 2005). Machado et al. (2010), utilizando 180 microssatélites identificaram QTLs significativos no cromossomo BTA11, BTA27 e em outros para a característica de resistência ao carrapato.

7.4 Conclusões

Para estes conjuntos de dados o método Bayes B permitiu identificar regiões genômicas associadas à susceptibilidade a CIB.

A partir dos estudos de associação genômica ampla foi possível identificar regiões genômicas nos cromossomos 3, 11, 14, 18, 26 e 27 associados à CIB em bovinos da raça Hereford.

Os termos MeSH *Retinal Cone photoreceptor cells* e *Blood Bactericidal Activity*, apontam para importantes processos biológicos que estão relacionados com a expressão fenotípica das lesões ocorridas pela CIB, fornecendo descobertas de potenciais genes candidatos para aumentar o conhecimento sobre os componentes genéticos ligados a susceptibilidade a CIB em animais da raça Hereford.

Referências

- AFFYMETRIX – **Axiom genome-wide bos 1array plate**. Disponível em: <http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/axiom_gw_bos1_arrayplate_datasheet.pdf>. Acesso em: 28 setembro 2017.
- ARAÚJO, F. L.; RICCIARDI, I. D. Atividade biológica do lipopolissacarídeo (LPS) de *Moraxella bovis*. **Review of Microbiology**, v. 19, p. 266-270, Sept. 1988.
- BARENDSE, W. Haplotype Analysis Improved Evidence for Candidate Genes for Intramuscular Fat Percentage from a Genome Wide Association Study of Cattle. **PLoS ONE**, 6, 12, 2011.
- BOICHARD, D. et al. Design of a Bovine Low-Density SNP Array Optimized for Imputation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, e34130, 2012.
- BOISON, S. A. et al. Strategies for single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping to enhance genotype imputation in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle: Comparison of commercially available SNP chips. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.7, p.4969-4989, 2015.
- CARDOSO, F. F. et al. Avaliação Genômica para Resistência ao Carrapato de Touro Hereford e Braford - Edição Dezembro/2013. **Documentos / Embrapa Pecuária Sul**, 2013.
- CARDOSO, D. F. **Assinaturas de seleção em três linhas de bovinos Nelore selecionados para características de crescimento**. 2016. 64 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.
- CARVALHEIRO, R. Accuracy of genotype imputation in Nelore cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.46, p.69, 2014.
- CASAS, E.; STONE, R. T. Putative quantitative trait loci associated with the probability of contracting infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 3180–3184, 2006.
- CASAS E.; SNOWDER, G. D. Putative quantitative trait loci associated with bovine pathogenic disease incidence. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2455–2460, 2008.
- CHEN, M. H. et al. Using Family-Based Imputation in Genome-Wide Association Studies with Large Complex Pedigrees: The Framingham Heart Study. **PLoS ONE**, 2012.
- CLAYTON, D. **SnpStats**: SnpMatrix and XSnpmatrix classes and methods. R package version 1.22.0. v, 2015.
- CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. *Moraxella bovis*: influência das características genóticas e fenóticas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 778-787, Jul. 2003.
- CUNNINGHAM, F. et al. Ensembl 2015. **Nucleic Acids Res.** 2015.

DAI, G. et al. Two structural components in CNGA3 support regulation of cone CNG channels by phosphoinositides. **Journal of General Physiology**, v. 141, n. 4, p. 413–430, Apr. 2013.

ELSIK, C. G. et al. The bovine hapmap consortium the genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, p. 522-528, Apr. 2009.

FERNANDO, R. L.; GARRICK, D. J.: **GenSel-User manual for a portfolio of genomic selection related analyses**. 2009.

GARRICK, D. J.; TAYLOR, J. F.; FERNANDO, R. L. Deregressing estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. **Genetics, selection, evolution : GSE**, v. 8, p. 1-8, 2009.

GIL TURNES, C. Ceratoconjuntivite bovina infecciosa. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. v. 1, p. 426.

HABIER, D. et al. Extension of the bayesian alphabet for genomic selection. **BioMC Proc**, v. 12, p. 186, 2011.

HORADAGODA, N. U. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, p. 437-441, 1999.

HUANG, Y. et al. Assessment of alternative genotyping strategies to maximize imputation accuracy at minimal cost. **Genetics Selection Evolution**, v. 44, p. 25, 2012.

HUSON, H. J. et al. Genome-wide association study and ancestral origins of the slick-hair coat in tropically adapted cattle. **Genetics**, v. 5, n. April, p. 1-12, 2014.

ILLUMINA. **BovineHD genotyping BeadChip**. Disponível em: <http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf> . Acesso em: 28 setembro 2017.

KHATKAR, M. S. et al. Strategies and utility of imputed SNP genotypes for genomic analysis in dairy cattle. **BMC Genomics**, v. 13, p. 538, 2012.

KILLINGER, A. H. et al. Economic impact of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. **Veterinary Medical, Small Animal Clinician**, v. 72, p. 618-620, Apr. 1977.

KIZILKAYA, K. et al. Genome-wide association study of infectious bovine keratoconjunctivitis in Angus cattle. **BMC Genetics**, v. 14, n. 23, 2013.

LEE, W. C. et al. Serum C-reactive protein in dairy herds. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 102-107, May 2003.

LEITE, A. G. B. et al. Morfologia do sistema ocular dos animais domésticos. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v.29, n.1, p. 42-51, 2013.

MACHADO, M. A. et al. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (Bos taurus × Bos indicus). **BMC Genomics**, 11:280, 2010.

MARCHINI, J.; HOWIE, B. Genotype imputation for genome-wide association studies. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 7, p. 499-511, 2010.

MARQUES, E. et al. Polymorphisms in positional candidate genes on BTA14 and BTA26 affect carcass quality in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 8, p. 2475-84, Aug. 2009.

MATUKUMALLI, L. K. et al. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. **Plos One**. San Francisco, v.4, n.4, p. 1-13, Apr. 2009.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1819–1829, 2001.

MENEZES, G. R. O. et al. Genômica aplicada ao melhoramento genético de bovinos de corte. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 213-225.

MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. **Trends Immunology**, v. 22, n. 6, p. 328- 87, Jun 2001.

OLIVIERI, B. F. **Estudo de associação entre polimorfismos de base única com características de eficiência de conversão, consumo e desempenho em bovinos da raça Nelore**. 2015. 77 F. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

ONTERU, S. K. Whole genome association studies of residual feed intake and related traits in the pig. **PLoS ONE**. 2012; 8: e61756. doi:10.1371/journal.pone.0061756.

PAUSCH, H. et al. Identification of QTL for UV-protective eye area pigmentation in cattle by progeny phenotyping and genome-wide association analysis. **PLoS ONE**, v.7, n. 5, 2012.

R CORE TEAM (2017). R: A Language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>.

SAATCHI, M. et al. Comparison of Different Bayesian 1233 Methods for QTL Mapping in Hereford Beef Cattle Using 1 Mb Windows. **Plant and Animal Genome Conference XX**. 18 Jan 2012. Disponível: <https://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper3217.html>. Acesso em: 29 nov. 2017.

SANTANA, M. H. A. et al. Genome-wide association study for feedlot average daily gain in Nelore cattle (*Bos indicus*). **Journal of Breeding and Genetics**, v. 131, p. 210-21, 2014a.

SANTANA, M. H. A. et al. Genome-wide association analysis of feed intake and residual feed intake in 629 Nelore cattle. **BMC Genetics**, 15, 21, 2014b.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. A new approach for efficient genotype 1238 imputation using information from relatives. **BMC Genomics**; 15: 478. doi: 10.1186/1471-2164-15-478. 2014.

SARIKAPUTI, M. et al. A new purification procedure for bovine C-reactive protein and serum amyloid P component. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 23, p. 1137–1142, 1991.

SCHRODL, W. et al. C-reactive protein as a new parameter of mastitis. **Tierärztliche Praxis**, v. 23, p. 337–341, 1995.

SILVEIRA, S. M. **Perfil de Alterações Genômicas em Angiofibromas Nasofaríngeos Juvenis**. 2008. 150 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

SNOWDER, G. D. et al. Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 507–518, 2005.

SOLLERO, B. P. et al. Tag SNP selection for prediction of tick resistance in Brazilian Braford and Hereford cattle breeds using Bayesian methods. **Genetics Selection Evolution**, 49:49. doi: 10.1186/s12711-017-0325-2, 2017.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2.ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1980. 633p.

TSUYUZAKI, K. et al. **MeSH ORA** framework: R/Bioconductor packages to support MeSH over-representation analysis. BMC – Bioinformatics, 2015.

TURNER, S. et al. Quality Control Procedures for Genome Wide Association Studies. **Current Protocols Human Genetics**, v.68, 2011.

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

WEIMER, T. A. et al. Identificação de marcadores moleculares no cromossomo bovino 18 associados ao intervalo entre partos em um rebanho Brangus-Ibagé. **Ciencia Rural**, v. 37, n. 5, p. 1502-1505, 2007.

WILCOX, G. E. The etiology of infectious bovine keratoconjunctivitis in Queensland. 1. Moraxella bovis. **Australian Veterinary Journal**, v. 46, p. 409-414, 1970.

WISSINGER, B. et al. CNGA3 Mutations in Hereditary Cone Photoreceptor Disorders. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 4, p. 722–737, Oct. 2001.

YI, N. et al. Bayesian Model Selection for Genome-Wide Epistatic Quantitative Trait Loci Analysis. v. 1344, n. July, p. 1333-1344, 2005.

ZANELLA, R. et al. Fine Mapping of Loci on BTA2 and BTA26 Associated with Bovine Viral Diarrhea Persistent Infection and Linked with Bovine Respiratory Disease in Cattle. **Frontiers Genetics**, v. 2, n. 82, doi: 10.3389/fgene.2011.00082. Nov. 2011.

8 Considerações gerais

Além de *Moraxella bovis*, único microrganismo comprovadamente capaz de causar CIB, outras duas espécies foram isoladas: *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*. As cepas de *Moraxella bovoculi* foram isoladas em todas as localidades abrangidas neste estudo, já a *Moraxella ovis* em duas delas (Alegrete e Dom Pedrito). Com base nestes resultados, conclui-se que outras bactérias do gênero *Moraxella* podem estar associadas à CIB.

A CIB interfere de forma clara na eficiência produtiva dos rebanhos bovinos, gerando grandes perdas econômicas (SLATTER et al., 1982; KIRKPATRICK e LALMAR, 2015). Portanto é de extrema importância que medidas efetivas de controle e profilaxia sejam realizadas. Por isso, é importante que as vacinas comerciais contra a CIB fossem compostas pelas três espécies de *Moraxella*, para que se tenham maiores porcentagens de cobertura contra a doença.

O valor de herdabilidade estimado para a susceptibilidade à CIB em bovinos Hereford neste estudo indica que progressos podem ser conseguidos usando esta medida como uma ferramenta para seleção animal, o que sugere que mais pesquisas e maior atenção deve ser dada a esta característica em programas de melhoramento.

A identificação das regiões genômicas associadas à susceptibilidade a CIB podem esclarecer *loci* que influenciam essa variável e apontar possíveis mecanismos fisiológicos. No estudo em questão, algumas regiões foram identificadas, como de maior efeito para a susceptibilidade à CIB. Ainda assim, deve-se enfatizar que o pequeno número de amostras analisadas pode ter contribuído para a redução do poder de detecção, de modo que importantes regiões podem não ter sido identificadas, salientando a necessidade de continuidade do trabalho.

Referências

ABIEC – **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE**. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2017.

AFFYMETRIX - **Axiom genome-wide bos 1array plate**. Disponível em: <http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/axiom_gw_bos1_arrayplate_datasheet.pdf>. Acesso em: 13 Jul. 2017.

ALENCAR, M. M. Cruzamentos para a produção de carne bovina. In: **CURSO DE MELHORAMENTO DE GADO DE CORTE DA EMBRAPA - GENEPLUS**, Campo Grande, MS - Embrapa Gado de Corte, 2010.

ALEXANDER, D. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 3, p. 487-503, Nov. 2010.

ALLEN, L. J.; GEORGE, L. W.; WILLITS, N. H. Effect of penicillin or penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 206, p. 1200-1203, Apr. 1995.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20-29, July 2017.

ANGELOS, J. A.; BALL, L. M.; BYRNE, B. A. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 23, p. 552-555, May. 2011.

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

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

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

ANGELOS, J. A. et al. *Moraxella bovoculi* spp. nov., isolated from calves with Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. **International Journal of System Evolution Microbiology**, London, v. 57, p. 789-795, Apr. 2007a.

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, p. 73-79, Nov. 2007b.

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

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

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

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

ANVISA – **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf>. Acesso em: 25 maio 2017.

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

ARDLIE, K. G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 299-309, 2002.

BARON, E. E. **Investigação de paternidade e seus efeitos no melhoramento de bovinos da raça Gír leiteiro**. 2000. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – 2000.

BLOOD, D.; RADOSTITS, O. M. **Medicina Veterinária**. New York: Interamericana McGraw-Hill, 1992. v. 2, p. 747.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 1998. 453p.

BOWLAND, A. E. et al. Estimation and management of genetic diversity in small populations of plains zebra (*Equus quagga*) in KwaZulu-Natal, South Africa. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 6, p. 563-583, Jun. 2001.

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

BROWN, J. F.; ADKINS, T. R. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 2551-2555, Dec. 1972.

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, 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, p. 1-2, May/Jun. 2014.

CAMPBELL, M.; MAHENTHIRALING, E.; SPEERT, D. P. Evaluation of Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4614–4615, Dec. 2000.

CARBONNELLE, E. et al. MALDI – TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 104-109, 2011.

CARDELLINO, R. A.; ROVIRA, J.; **Mejoramiento genético animal**. Montevideo, Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R. L. 1987. 253p.

CARDOSO, F. F. In: BARCELLOS, J. O. J.; CHRISTOFARI, L. F.; LOPA, T. P.; **Caderno de atualização técnica e julgamento de Hereford e Braford**, Porto Alegre, Associação Brasileira de Hereford e Braford, 2007, 173p.

CARDOSO, F. F. et al. Avaliação Genômica para Resistência ao Carrapato de Touros Hereford e Braford - Edição Dezembro/2013. **Documentos / Embrapa Pecuária Sul**, ISSN 1982-5390; 133, 2013.

CASTILLO, C. F.; CANCELO, J. L. B. Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v. 1, n. 2, 2007.

CHANDLER, R. L.; BAPTISTA, P. J. H. P.; TURFREY, B. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 89, p. 441-448, Jul. 1979.

CHANDLER, R. L.; SMITH, M. D.; TURFREY, B. A. Ultra structural and histological studies on the corneal lesion in infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 91, p. 175-184, Apr. 1981.

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**, Goiania, v. 9, p. 256-261, Mar. 2008.

CHATELLIER, S. et al. Genetic characterization of Streptococcus agalactiae strains by RAPD fingerprinting identification of particularities of virulent clone families that cause meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2573-2579, Oct. 1997.

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

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

CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. *Moraxella bovis*: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 778-787, Jul. 2003.

CONCEIÇÃO, F. R. **Caracterização antigênica e molecular de isolados de *Moraxella bovis* recuperados em surtos de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina ocorridos entre 1974 e 2001 na Argentina, Brasil e Uruguai**. 2002. 196f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

COSTA, G. M. et al. Descrição de um surto de Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina em uma propriedade no sul de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 1, p. 25-29, Jan. / Apr. 2008.

DECKER, J. E. et al. A novel analytical method, Birth Date Selection Mapping, detects response of the Angus (*Bos taurus*) genome to selection on complex traits. **BMC Genomics**, v. 13, p. 606, 2012.

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

EISENSTEIN, B. I. The Polimerase Chain Reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 3, p. 178-183, 1990.

ELAD, D.; YERUHAM, I.; BERNSTEIN, M. *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe**, Berlin, v. 35, p. 431-434, Jun. 1988.

ELSIK, C. G. et al. The bovine hapmap consortium the genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, p. 522-528, Apr. 2009.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464 p.

FARIA, C. U. et al. Inferência bayesiana e sua aplicação na avaliação genética de bovinos da raça nelore: revisão bibliográfica. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 1, p. 75-86, 2007.

FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. Parceria público x privada no desenvolvimento de pesquisa em melhoramento genético animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 216-222, 2010.

FREITAS, A. R. Avaliação de procedimentos na estimação de Parâmetros genéticos em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 94 – 102, 2000.

FRISCH, J. E. The relative incidence and effect of bovine infectious keratoconjunctivitis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Animal Production**, v. 21, p. 265-274, Dec. 1975.

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

GEORGE, L. W. Antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 80, p. 229-235, Jun. 1990.

GERHARD, R. R., ALLEN, J. W.; GREENE, W. H. The role of face flies in an episode of Infectious Bovine-Keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 156-159. Jan. 1982.

GIL TURNES, C. Ceratoconjuntivite Bovina Infecciosa. Doenças de ruminantes e equinos. 3ª ed. Santa Maria, Editora Pallotti, 2007, v.1, p. 267-278.

GIL TURNES, C. Ceratoconjuntivite bovina infecciosa. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. v. 1, p. 426.

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

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programs. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 6, p. 381-391, 2009.

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

GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, Belo Horizonte, v.1, n. 3, nov. 2013. Disponível em: <<http://sbsc.org.br/nanocell/maldi-tof-uma-ferramentarevolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>>. Acesso em: 14 de junho de 2017.

GOULD, A. S. et al. Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 108–115, May. 2013.

HAYES, B.; GODDARD, M. Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. **Genome**, v. 53, p. 1024-1028, Nov. 2010.

HAYES, B. J.; LEWIN, H. A.; GODDARD, M. E. The future of livestock breeding: Genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. **Trends in Genetics**, v. 29, p. 206–214, Apr. 2013.

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

KILLINGER, A. H., VALLENTINE, D.; MANSFIELD, M. E.; RICKETTS, G. E.; NEUMAN, A. H.; NORTON, H. W. Economic impact of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. **Veterinary Medical, Small Animal Clinician**, v. 72, p. 618-620, Apr. 1977.

KIRKPATRICK, J. G.; LALMAN, D. **Pinkeye in cattle infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK).** Disponível em: < <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document2689/VTMD9128web.pdf>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

KIZILKAYA, K. et al. Genome-wide association study of infectious bovine keratoconjunctivitis in Angus cattle. **BMC Genetics**, v. 14, n. 23, 2013.

KODJO, A.; EXBRAYAT, P.; RICHARD, Y. Identification of *Moraxella bovis* and related species from calves with IBK and goats by qualitative genetic transformation assay. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, p. 336-343, 1994.

LEAL, C. R. B. **Uso da ERIC-PCR para a caracterização de amostras de *Leishmania chagasi*.** 2010. 77 f. Tese (Doutorado e Saúde e Desenvolvimento) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campo Grande – 2010.

LOPES, F. B. **Objetivos e critérios de seleção para dois sistemas de criação de caprinos leiteiros no Brasil.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade de Goiás, Goiânia – GO, 2011.

MABONI, G. **Perfil de suscetibilidade de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis* aos antimicrobianos.** 2013. 56 F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2013.

MAIA, J. M. S. **Utilização de uma formulação de Cloxacilina nanoestruturada no tratamento da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina.** 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras – Minas Gerais. 2015.

MARRS, C. F.; RUEHL, W. W.; FALKOW, S. Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of pilin genes. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3032-3039, Jul.1988.

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

MATUKUMALLI, L.K.; LAWLEY, C.T.; SCHNABEL, R.D. et al. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. **PLoS ONE**, v.4, n.4, e5350, 2009.

McCONNEL, C. S.; SHUM, L.; HOUSE, J. K. Antimicrobial susceptibility of Australian bovine *Moraxella* isolates. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 85, p. 85-70, Jan. – Feb. 2007.

MELO, L. F. **A utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF na identificação de microrganismos no controle de qualidade farmacêutico.** 2014. 41 f. Monografia (Especialista em Microbiologia Industrial e Ambiental) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2014.

MENEZES, G. R. O.; REGITANO, L. C. A.; SILVA, M. V. G. B.; CARDOSO, F. F.; SILVA, L. O. C.; SIQUEIRA, F.; EGITO, A. A. Genômica aplicada ao melhoramento genético de bovinos de corte. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético**

aplicado em gado de corte: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.213-225.

MORO, G. V. **Seleção assistida por marcadores moleculares.** In: Seminários em genética e Melhoramento de Plantas, 2010, Piracicaba. Disponível em:< <http://www.genetica.esalq.usp.br/semina.php>>.

MURPHY, N. B.; PELLECC, R. The use of arbitrary *primers* and the RADES methods for the rapid identification of developmentally regulated genes in trypanosomes. **Gene**, v. 141, p. 53-61, Apr. 1994.

NIETO, L. M.; ALENCAR, M. M.; ROSA, A. N. Critérios de seleção. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte:** Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 109-122.

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

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

O'NEILL, C. J.; SWAIN, D. L.; KADARMIDEEN, H. N. Evolutionary process of *Bos taurus* cattle in favourable versus unfavourable environments and its implications for genetic selection. **Evolutionary Applications**, v. 3, p. 422-433, 2010.

PAUSCH, H. et al. Identification of QTL for UV-protective eye area pigmentation in cattle by progeny phenotyping and genome-wide association analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

POSTMA, G.C.; CARFAGNINI, J. C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 81, p. 449-458, Nov. 2008.

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

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

PUNCH, P. I. et al. Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. **Research in Veterinary Science**, London, v. 39, p. 179-187, Sep. 1985.

RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, v. 9, p. 275-280, Aug. 1993.

REBHUN, G. W. Oftalmopatias. In: **Doenças do Gado Leiteiro**. São Paulo: Editora Roca, 2000, 140 p.

RODRIGUES, J. E. **Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in Angus cattle**. 2006. 116 f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Iowa State University, Ames, 2006.

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, p. 310-319, Apr. 1991.

ROSSMANN, H. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos**. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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

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

SAIKI, R. K. et al. *Primer* directed enzymatic amplification DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487- 491, Jan. 1988.

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology**. 2.ed. San Diego: MCC Press, 2006. 257p.

SLATTER, D.H.; EDWARDS, M.E.; HAWKINS, C.D. et al. A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Australian Veterinary Journal*, Sidney, v.59, p.65-68, 1982.

SNOWDER, G. D. et al. Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in pre weaned beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 507-518, Mar. 2005.

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

SOUZA, M. A.; **Imputação de alelos microssatélites apartir de heplótipos SNP para verificação de paternidade na raça Nelore**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

STEVENSON, L.G.; DRAKE, S.K.; MURRAY, P.R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 444-447, mar. 2010.

SUTTON, S. V. W.; CUNDELL A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharmacopeial Forum**, v. 30, p. 1884-1894, set./ out. 2004.

TIBAYRENC, M. Population genetics and strain typing of micro-organisms: how to detect departures from panmixia without individualising alleles and loci. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris**, v. 318, p. 135-139, 1995.

TORRES, V. S. **Bases microbiológicas de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en Uruguay**. 2013. 189 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo - Uruguay, 2013.

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

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

Anexos

Anexo A: Comparação entre as diferentes técnicas de identificação dos agentes envolvidos em surtos de CIB.

Nº	Amostras	Bateria Bioquímica							Identificação - Bioquímica	Identificação - MALDI-TOF	Identificação por PCR	Identificação - Sequenciamento
		Hemólise	GRAM	Morfologia	Catalase	Oxidase	Nitrato	Gelatinase	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
1	Taim- 1	+	-	CB	+	+	-	+	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	Não enviado para análise
2	1213 NE	+	-	CB	+	+	-	+	<i>Moraxella bovis</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovoculi</i>	Problemas na amostra
3	324 OE	+	-	CB	+	+	-	+	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	Não enviado para análise
4	<i>M. ovis</i>	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella ovis</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i> – 100%
5	Taim - 2	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
6	JUR-1988	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
7	6052 OE	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
8	181 OD	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
9	67 OD	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
10	1368 OD	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
11	1138 OE	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
12	1192 OD	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
13	916 NE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	Não conclusivo	Não enviado para análise
14	281 OD	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
15	171 OE	+	-	CB	-	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> - 99%
16	5623 OE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
17	144 NE	+	-	CB	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
18	313 OD	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
19	666 OD	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
20	330 NE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
21	259 OD	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise

DC = Diplococos / CB = Cocobacilos

Continua.

Anexo A: Comparação entre as diferentes técnicas de identificação dos agentes envolvidos em surtos de CIB.

Nº	Amostras	Bateria Bioquímica							Identificação - Bioquímica	Identificação - MALDI-TOF	Identificação - PCR	Identificação - Sequenciamento
		Hemólise	GRAM	Morfologia	Catalase	Oxidase	Nitrato	Gelatinase	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
22	29 OE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
23	976 NE	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
24	151 OE	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
25	1295 OD	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
26	30 OE	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não é <i>Moraxella</i>	Não conclusivo	Não enviado para análise
27	391 OE	+	-	CB	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
28	1362 OE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não é <i>Moraxella</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i> – 100%
29	581 ND	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não é <i>Moraxella</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
30	682 ND	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não é <i>Moraxella</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i> – 100%
31	6477 OD	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
32	928 NE	+	-	CB	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
33	175 NE	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
34	187 OD	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não é <i>Moraxella</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
35	976 OD	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> -99%
37	120 ND	+	-	CB	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
38	874 OE	+	-	CB	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
39	347 NE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	Não conclusivo	Não enviado para análise
40	128 OE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%

DC = Diplococos / CB = Cocobacilos

Continua.

Anexo A: Comparação entre as diferentes técnicas de identificação dos agentes envolvidos em surtos de CIB.

Nº	Amostras	Bateria Bioquímica							Identificação - Bioquímica	Identificação - MALDI-TOF	Identificação - PCR	Identificação - Sequenciamento
		Hemólise	GRAM	Morfologia	Catalase	Oxidase	Nitrato	Gelatinase	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
41	338 NE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
42	120 OD	+	-	CB	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise
43	87 NE	+	-	CB	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella ovis</i>	<i>Moraxella ovis</i> ¹ - 92%
44	104 OE	+	-	CB	-	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 100%
45	6587 OD	+	-	DC	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
46	6430 OD	+	-	DC	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
36	198 NE	+	-	DC	+	+	+	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella ovis</i>	<i>Moraxella ovis</i> ¹ – 92%
47	6117 ND	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella ovis</i>	<i>Moraxella ovis</i> ¹ – 92%
48	6587 ND	+	-	DC	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
49	6219 OD	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
50	194 OD	+	-	DC	+	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
51	6360 NE	+	-	DC	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
52	6456 OE	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
53	391 OD	+	-	DC	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Identificação não confiável	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
54	171 OD	+	-	DC	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%
55	6213 OD	+	-	CB	-	+	-	-	<i>Moraxella bovoculi</i>	Não enviado para análise	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovis</i> – 99%

DC = Diplococos / CB = Cocobacilos

¹identificação não confiável.