

## Identificação molecular de espécies de *Moraxella* spp. associadas à ceratoconjuntivite infecciosa bovina no município de Juiz de Fora, Zona da Mata do estado de Minas Gerais

Mayssa da Silva Teixeira<sup>(1,8)</sup>, Valquíria da Silva Oliveira<sup>(2)</sup>, Samara Moreira Campos<sup>(2)</sup>, Bruna Camargo da Fonseca<sup>(2)</sup>, Ana Clara Koch de Assis Brega<sup>(2)</sup>, Daniele Ribeiro Lima Reis Faza<sup>(3)</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>(4)</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>(4)</sup>, Emanuelle Baldo Gaspar<sup>(4)</sup> e Robert Domingues<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(2)</sup>Bolsista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(3)</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(4)</sup>Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(5)</sup>E-mail: mayssateixeira.silva@estudante.ufjf.br.

**Resumo** — A Ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é causada por bactérias do gênero *Moraxella*, sendo *Moraxella bovis* associada à doença. No entanto, outras espécies têm sido isoladas de bovinos com sintomas clínicos, levantando dúvidas sobre sua participação na etiologia. Ainda existem lacunas quanto à diversidade genômica, fatores de virulência e diferenças regionais entre os isolados, aspectos que podem influenciar na eficácia de vacinas e terapias. Assim, este estudo teve por objetivo realizar a identificação molecular de isolados de *Moraxella* spp. obtidos de bovinos com sinais clínicos de CIB em propriedade da Zona da Mata/MG. As amostras foram cultivadas em meio ágar-sangue, submetidas a testes bioquímicos e, posteriormente, o DNA dos isolados foi extraído. A região intergênica 16S-23S rRNA foi amplificada por PCR e analisada por eletroforese em gel de agarose para identificação molecular dos isolados. Foram identificadas as espécies *Moraxella bovoculi* e *Moraxella oculi*. Estes resultados estão de acordo com os recentemente obtidos em que *M. bovis* não foi isolada de animais com CIB em surto da doença no qual *M. oculi* e *M. bovoculi* haviam sido.

Termos para indexação: gado leiteiro, sanidade animal, doença ocular bovina, PCR, diversidade bacteriana, variabilidade genética, 16S-23S rRNA.

## Molecular identification of *Moraxella* spp. species associated with bovine infectious keratoconjunctivitis in the municipality of Juiz de Fora, Zona da Mata region of the state of Minas Gerais

**Abstract** — Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is caused by bacteria of the *Moraxella* genus, with *Moraxella bovis* being traditionally associated with the disease. However, other species have been isolated from cattle showing clinical symptoms, raising questions about their role in the etiology. There are still gaps regarding genomic diversity, virulence factors, and regional differences among isolates, aspects that may influence the effectiveness of vaccines and therapies. Therefore, this study aimed to perform the molecular identification of *Moraxella* spp. isolated from cattle showing clinical signs of IBK on a farm located in the Zona da Mata region of Minas Gerais, Brazil. The samples were cultured on blood agar, subjected to biochemical tests, and subsequently, DNA from the isolates was extracted. The 16S–23S rRNA intergenic region was amplified by PCR and analyzed by agarose gel electrophoresis for molecular identification of the isolates. The species *Moraxella bovoculi* and *Moraxella oculi* were identified. These results are consistent with recent findings in which *M. bovis* was not isolated from outbreaks where *M. oculi* and *M. bovoculi* were present.

Index terms: dairy cattle, animal health, bovine ocular disease, PCR, bacterial diversity, genetic variability, 16S-23S rRNA.

## Introdução

A pecuária leiteira é uma das bases da economia brasileira e fatores relacionados à saúde dos rebanhos têm potencial de afetar de forma impactante tanto a produtividade quanto o bem-estar animal. Neste aspecto, algumas doenças infecciosas como a ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) geram prejuízos econômicos ao reduzirem a produtividade e imputarem gastos com tratamento, além de comprometerem o bem-estar animal e trazerem riscos à saúde da população humana pelo uso contínuo de antibióticos e seleção de bactérias resistentes (O'Connor, 2021).

A CIB é uma enfermidade ocular altamente contagiosa que acomete rebanhos bovinos no mundo todo e, em especial, animais em idades mais jovens como bezerras e novilhas, devido à imaturidade do sistema imune. Os sintomas mais comuns encontrados são lacrimejamento excessivo, fotofobia, blefaroespasma, edema, dor ocular e, em casos mais graves, ulceração de córnea, podendo gerar perfuração e, por consequência, perda da visão. Sabe-se que o gênero bacteriano *Moraxella* está intimamente associado a doenças oculares em mamíferos e historicamente somente a espécie *Moraxella bovis* foi confirmada como causadora da CIB, sendo a única até o momento a atender os postulados de Koch (Loy et al., 2021). No entanto, estudos recentes indicaram a existência de outras espécies do mesmo gênero isoladas de animais com sinais oculares compatíveis com essa condição, o que levanta hipóteses sobre a complexidade da etiologia da doença e a participação dessas outras espécies (Carvalho et al., 2025). Outros estudos mais modernos têm avançado na compreensão da CIB, demonstrando a diferença de proporção de espécies de *Moraxella* presentes no animal antes e depois do aparecimento de surtos da doença (Anis et al., 2023).

Apesar de sua relevância, ainda existem lacunas quanto à transmissibilidade da CIB e os fatores que influenciam a susceptibilidade dos animais, incluindo condições ambientais e de manejo, como a estação do ano em que a doença é mais prevalente, o tipo de criação (confinamento, semi-confinamento ou extensiva), o nível de imunidade dos animais, a presença de vetores e possíveis portas de entrada para o agente infeccioso, dentre outros fatores. Além disso, existem pontos não esclarecidos sobre a diversidade genômica das espécies de *Moraxella* envolvidas na doença, a presença de fatores de virulência e as diferenças genéticas entre isolados de distintas regiões geográficas, aspectos esses que podem influenciar diretamente na eficácia de vacinas que vierem a ser produzidas com linhagens oriundas de outros territórios (Maier et al., 2021). Assim, compreender essa variabilidade genética é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes e adaptadas à realidade regional. Nesse contexto, a identificação molecular das espécies de *Moraxella* presentes em surtos de CIB surge como uma ferramenta poderosa para compreender a fisiopatologia desses agentes e auxiliar no desenvolvimento de medidas de controle, como vacinas mais específicas e medicamentos mais eficazes. Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo realizar a identificação molecular de diferentes espécies de *Moraxella* spp. isoladas de bovinos leiteiros visando contribuir para o entendimento da variabilidade genética associada à CIB.

O conteúdo desta publicação vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 3 – Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades, ODS 12 – Consumo e produção responsáveis: assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis” (Nações Unidas, 2025).

## Material e métodos

O estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez e no Laboratório de Microbiologia do Leite, ambos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora (MG). As amostras foram coletadas de seis bezerros, com idade entre 15 e 60 dias, dentre eles três animais da raça Holandesa e três da raça Girolando, todos provenientes de uma propriedade leiteira da região de Juiz de Fora, MG, dos quais três apresentavam sinais clínicos compatíveis de CIB.

Previamente, uma primeira coleta de amostras de animais em lactação foi realizada na mesma propriedade, em um cenário inicial em que os animais ou não apresentavam sinais ou demonstravam poucos sintomas da doença, e não puderam ser isoladas bactérias do gênero *Moraxella* nesses indivíduos. Após 33 dias, em uma nova visita a essa mesma propriedade para uma segunda coleta, evidenciou-se animais mais jovens com presença de sintomas marcantes de CIB, sendo esses o objeto de estudo deste trabalho. Destaca-se, ainda, que o proprietário havia adquirido novos animais e introduzido-os próximo ao lote de bezerros no mesmo confinamento, sem passar por quarentena.

Na segunda visita as amostras foram coletadas utilizando swabs das regiões nasais e oculares, com estriamento imediato em meio ágar-sangue e incubadas em estufa a 35 °C em laboratório. A partir deste crescimento inicial, colônias de colorações esbranquiçadas a branco acinzentadas, pequenas, circulares, lisas e translúcidas, sugestivas do gênero *Moraxella*, foram isoladas e reincubadas por 48h. Tendo em vista a possibilidade de mais de uma colônia ser indicativa do gênero, as amostras referentes a cada animal originaram mais de um isolado, totalizando, no final, 40 isolados provenientes de seis animais.

Após o crescimento bacteriano, foram realizados testes bioquímicos de catalase, oxidase e coloração de Gram. Os isolados que apresentaram resultado positivo para catalase e oxidase, coloração Gram-negativa e morfologia compatível com cocos, diplococos ou cocobacilos, características típicas do gênero *Moraxella*, foram selecionados para as análises moleculares. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio, e o material obtido foi utilizado como molde para amplificação do fragmento da região intergênica 16S-23S rRNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) mediante a utilização de primers denominados ISRup (forward) e ISRdown (reverse) de sequência ACCGACGCTTATCGCAGGCTATCA e GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT, respectivamente. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, juntamente com controles de DNA das espécies *M. bovis*, *M. bovoculi*, *M. oculi* e *M. tarda*, além de um marcador molecular de 50 pares de bases.

## Resultados e discussão

Na primeira visita à propriedade, quando foram coletadas amostras dos animais adultos, foram obtidos 43 isolados, porém, nenhum pôde ser confirmado como pertencente ao gênero *Moraxella*. Havia uma suspeita de surto na localidade porém, embora alguns animais apresentassem lacrimejamento, não foi possível a observação de úlceras nas córneas. Já os resultados referentes à segunda coleta, nos bezerros que apresentavam sinais clínicos de CIB, resultaram em 38 isolados, de um total de 40, confirmados como pertencentes ao gênero estudado, das espécies *Moraxella bovoculi* (72,5%) e *Moraxella oculi* (22,5%), como pode ser visto na Tabela 1. Interessante observar que especificamente neste surto a espécie *Moraxella bovis* não foi identificada em nenhum dos isolados, enquanto a *Moraxella oculi* pôde ser identificada pela segunda vez em um surto no Brasil. O isolamento apenas

de *M. bovoculi* e *M. oculi* no surto deste estudo reforça o questionamento do real papel destas duas espécies em surtos de CIB.

Tabela 1. Resultados de isolamento bacteriano e identificação molecular.

Espécie	Coleta 1		Coleta 2	
	Isolados (43)	isolados (%)	Isolados (40)	isolados (%)
<i>M. bovis</i>	0	0	0	0
<i>M. bovoculi</i>	0	0	29	72,5%
<i>M. oculi</i>	0	0	9	22,5%
<i>M. tarda</i>	0	0	0	0

A ocorrência de surto na fazenda pode estar relacionada a alguns fatores observados na localidade e características do período. A elevação da temperatura ambiente na primavera/verão cria condições favoráveis à maior incidência de insetos, favorecendo a transmissão da CIB. De todo modo, o manejo inadequado, com o curral muito próximo das estradas, o contato muito próximo entre animais doentes e sadios e a não separação de animais adquiridos de outras fazendas podem ter contribuído para o surgimento do surto nesta propriedade.

## Conclusões

Foram identificados 38 isolados de bactérias do gênero *Moraxella* a partir de seis bezerros com sintomas clínicos característicos de CIB, sendo 72,5% *M. bovoculi* e 22,5% *M. oculi* de uma propriedade leiteira da região de Juiz de Fora (MG).

## Agradecimentos

Ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig). Processo FAPEMIG APQ-00957-23 Caracterização biológica e genômica de espécies de *Moraxella* spp. presentes em surtos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina em rebanhos de Minas Gerais.

Ao proprietário da fazenda colaboradora, Sr. Rodrigo. Ao Médico Veterinário Bruno Medeiros. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da bolsa recebida do Programa Pibic, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; ao analista Robert Domingues pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento, a toda equipe do Laboratório de Genética Molecular Mário Luiz Martinez pelo apoio, aprendizado e colaboração.

## Referências

ANIS, E.; KATTOOR, J. J.; GREENING, S. S.; JONES, L.; WILKES, R. P. Investigation of the pathogens contributing to naturally occurring outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye) using next generation sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 282, 109752, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109752>.

CARVALHO, C. V. de; DOMINGUES, R.; COUTINHO, C. de C.; HONÓRIO, N. T. de B. S.; REIS, D. R. de L.; FERREIRA-MACHADO, A. B.; CARVALHO, W. A.; GASPAR, E. B.; MARTINS, M. F. First report of *Moraxella oculi* in Brazil in an infectious bovine keratoconjunctivitis outbreak. **Veterinary Research Communications**, v. 49, article 143, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-025-10713-z>.

LOY, J. D.; HILLE, M.; MAIER, G.; CLAWSON, M. Component causes of infectious bovine keratoconjunctivitis-the role of *Moraxella* species in the epidemiology of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 279-293, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.03.004>.

MAIER, G.; O'CONNOR, A. M.; SHEEDY, D. The evidence base for prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis through vaccination. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 341-353, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.03.009>.

NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 20 out. 2025.

O'CONNOR, A. M. Infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. xi-xii, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.04.001>.