

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Prevalência de patógenos relacionados a mastite bovina, identificados por espectrometria de massas, em dípteros capturados no ambiente de ordenha

Amanda Bezerra Bertolini

BOTUCATU, SP

Abril, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Prevalência de patógenos relacionados a mastite bovina, identificados por espectrometria de massas, em dípteros capturados no ambiente de ordenha

Amanda Bezerra Bertolini

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Associado Márcio Garcia  
Ribeiro

BOTUCATU, SP  
Abril, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bertolini, Amanda Bezerra.

Prevalência de patógenos relacionados a mastite bovina, identificados por espectrometria de massas, em dípteros capturados no ambiente de ordenha / Amanda Bezerra Bertolini. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Prof. Associado Márcio Garcia

Ribeiro

Capes: 50502000

1. Mastite. 2. Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz. 3. Microbiota. 4. Dípteros. 5. Noxas.

Palavras-chave: Infecções mamárias em vacas; MALDI-TOF MS; Microbiota de moscas; Patógenos ambientais e contagiosos.

Nome da autora: Amanda Bezerra Bertolini

Título: Prevalência de patógenos relacionados a mastite bovina, identificados por espectrometria de massas, em dípteros capturados no ambiente de ordenha

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Ass. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Membro Titular

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Titular Helio Langoni

Membro Titular

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. Gabriel Augusto Marques Rossi

Membro Titular

Departamento Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Universidade Vila Velha, ES

Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Membro Titular

Departamento de Pesquisa

Unidade Regional de Pesquisa e Desenvolvimento

APTA/Bauru, SP

Data da defesa: 19 de abril de 2022.

Dedico está tese aos meus pais Aromes José Bezerra e Angeli Chagas Bezerra, que renunciaram de seus sonhos para realizar os meus, que me ensinaram a sonhar alto e sempre acreditaram no meu potencial.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, professor Márcio Garcia Ribeiro, por ter me aceitado como orientada mesmo sabendo das minhas limitações de tempo e pela paciência e dedicação em me ensinar.

A Patrícia Thýssen, professora de entomologia da Unicamp e sua orientada Aline Marrara pela recepção calorosa, treinamento e realização da identificação dos dípteros.

Ao técnico de laboratório Fernando José Paganini Listoni, por toda a ajuda e ensinamento, sem dúvidas, um profissional que faz toda diferença na vida dos alunos e pós-graduandos.

Ao meu marido Pedro Mady Bertolini pelo apoio e incentivo.

A todos os colegas de departamento, que sempre se mostraram dispostos a ajudar, mesmo com as limitações do momento pandêmicos em que vivemos.

A todos os professores e funcionários do ensino público, que mesmo com todas as dificuldades da falta de recursos e investimentos na educação e na ciência, lutam bravamente para manter a pesquisa e a qualidade do ensino superior.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de micro-organismos de interesse em mastite, identificados em dípteros capturados no ambiente de ordenha, diagnosticados por MALDI-TOF MS* (2019-2020).. .....	32
Tabela 2: Identificação entomológica de famílias, gêneros e/ou espécies de dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas seguido dos micro-organismos de interesse em mastite (2019-2020).....	36
Tabela 3: Prevalência de famílias de dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas seguido dos micro-organismos de maior prevalência de interesse em mastite correlacionados com as fazendas onde ocorreram as capturas (2019-2020).....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de agentes de origem ambiental e contagiosa relacionados a mastite bovina, e outros micro-organismos (miscelânea) isolados de dípteros capturados no ambiente de ordenha de vacas (2019-2020).....	34
---	----

# SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Características gerais dos dípteros .....	15
2.1.1 Família Muscidae.....	16
2.1.2 Família Tachinidae.....	16
2.1.3 Família Sphaeroceridae .....	16
2.1.4 Família Drosophilidae.....	17
2.1.5 Família Sepsidae .....	17
2.1.6 Família Ulidiidae .....	17
2.1.7 Família Syrphidae .....	17
2.1.8 Família Calliphoridae.....	17
2.1.9 Família Chloropidae.....	18
2.1.10 Família Sarcophagidae .....	18
2.1.11 Família Piophilidae .....	18
2.3 Dípteros como vetores de patógenos.....	18
2.5 Reflexos dos dípteros na Saúde Pública.....	21
2.2 Dípteros no ambiente de ordenha.....	22
2.4 Aspectos da etiologia, epidemiologia e controle da mastite bovina.....	23
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos .....	25
<b>4.0 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 Comissão de Ética .....	25
4.2 Cálculo amostral.....	25
4.3 Características das fazendas .....	26
4.4 Colheita e processamento das amostras .....	27
4.5 Identificação dos dípteros.....	27
4.6 Cultivo bacteriológico .....	27
4.7 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-TOF MS.....	28
4.8 Estoque de isolados e dos dípteros .....	29
4.9 Análise estatística.....	29
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>

5.1 Identificação dos dípteros.....	29
5.2 Cultivo microbiológico e identificação dos micro-organismos .....	30
5.3 Distribuição dos micro-organismos de interesse em mastite bovina; .....	33
5.3.1 Ambientais.....	33
5.3.2 Miscelânea .....	33
5.3.3 Contagiosos .....	34
5.4 Relação entre dípteros e identificação microbiana com ênfase em agentes de mastite bovina.....	35
5.5 Prevalência de micro-organismos por fazenda.....	38
<b>6. Discussão .....</b>	<b>38</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>49</b>
<b>8. REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 1: Prevalência, por fazenda, de micro-organismos identificados em dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas, diagnosticados por espectrometria de massas*.</b> .....	<b>63</b>
<b>ARTIGO* .....</b>	<b>66</b>

BERTOLINI, A. B. **Prevalência de patógenos relacionados a mastite bovina, identificados por espectrometria de massas, em dípteros capturados no ambiente de ordenha.** Botucatu, 2021. 95p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

## RESUMO

São conhecidas mais de 150 mil espécies de dípteros, que podem veicular cerca de 200 micro-organismos patogênicos e mais de 65 doenças para humanos e animais, incluindo a mastite em animais domésticos. A mastite bovina é a doença que acarreta maiores prejuízos econômicos em animais destinados a produção de leite, cujos patógenos são tradicionalmente classificados em contagiosos e ambientais. Apesar da complexidade de espécies e do potencial de transmissão de patógenos, são escassos os estudos investigando bactérias relacionadas à ocorrência de mastite bovina em dípteros capturados no ambiente de ordenha, tampouco utilizando métodos moleculares para a detecção dos micro-organismos. Neste cenário, foram coletados 217 espécimes de insetos em nove diferentes fazendas (24 amostras/fazenda) de manejo similar localizadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo, Brasil. Os espécimes de dípteros foram submetidos a identificação entomológica de famílias e espécies. Foram identificadas 11 famílias de dípteros, com predomínio da Muscidae (152/217=70%), seguida da Tachinidae (23/217=10,6%). A totalidade dos espécimes de dípteros foi submetida ao cultivo microbiológico utilizando meios convencionais (ágar sangue e MacConkey) e seletivos (caldo EC e Onefarm SmartColor 2™) e os isolados foram identificados por espectrometria de massas. A partir dos espécimes foram identificados 275 micro-organismos - isolados ou em associação. Considerando a classificação tradicional dos agentes de mastite bovina, foi identificado o predomínio de isolados de origem ambiental (166/275=60,4%) nos dípteros, com maior frequência de *Enterococcus* spp. (70/275= 25,4%) e *Escherichia coli* (49/275= 17,8%) e menor frequência de contagiosos (32/275=11,6%). Em 28% (77/275) dos isolados foram detectados agentes não tradicionais de mastite bovina (miscelânea), embora foram identificados patógenos relacionados à infecções/ intoxicações em humanos, como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e espécies de *Acinetobacter*. Na família Muscidae foram identificados 186 isolados, dos quais 66,1% (123/186) ambientais, com predomínio de *Enterococcus* spp. (47/186=25,3%) e *Escherichia coli* (36/186=19,3%), enquanto na família Tachinidae foram identificados 38 isolados identificados com maior frequência de miscelânea (20/38=52,6%); Infere-se a elevada complexidade de micro-organismos que podem ser veiculados por dípteros capturados no ambiente de ordenha de vacas, incluindo agentes de mastite bovina principalmente de origem ambiental, bem como patógenos associados a infecções e intoxicações alimentares de relevância em saúde humana.

**Palavras-chave:** microbiota de moscas, MALDI-TOF MS, Infecções mamárias em vacas, patógenos ambientais e contagiosos.

BERTOLINI, A. B. **Prevalence of pathogens related to bovine mastitis, identified by mass spectrometry, in dipterans captured in the milking environment.** Botucatu, 2021. 95p, Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

## ABSTRACT

More than 150,000 species of diptera are known, which can transmit about 200 pathogenic microorganisms and more than 65 diseases in humans and animals, including mastitis in domestic animals. Bovine mastitis is the disease that causes the greatest economic losses in animals intended for milk production, whose pathogens are traditionally classified as “contagious” or “environmental”. Despite the complexity of species and the potential for transmission of pathogens, studies investigating bacteria related to the occurrence of bovine mastitis in dipterans captured in the milking environment, are scarce, neither use molecular methods for the detection of microorganisms. In this scenario, 217 flying insects specimens were collected in nine different farms (24 samples/farm) of similar management located in the states of Minas Gerais and São Paulo, Brazil. Diptera specimens were submitted to entomological identification of families and species. Eleven families of diptera were identified, with a predominance of Muscidae (152/217= 70%), followed by Tachinidae (23/217=10,6%). All specimens of Diptera were subjected to microbiological culture using conventional (blood agar and MacConkey) and selective media (EC broth and Onefarm SmartColor 2™), and the isolates were identified by mass spectrometry. From the specimens, 275 microorganisms were identified - isolated or in association. Considering the traditional classification of bovine mastitis agents, was observed a predominance of isolates from environmental origin (166/275=60.4%) in Diptera, with a higher frequency of *Enterococcus* spp. (70/275=25.4%) and *Escherichia coli* (49/275=17,8%) and lower frequency of contagious (32/275=11.6%). In 28% (77/275) of the isolates, non-traditional agents of bovine mastitis (miscellaneous) were detected, although pathogens related to infections/intoxications in humans, such as *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter* species were identified. In the Muscidae family, 186 isolates were identified, of which 66.1% (123/186) were environmental, with a predominance of *Enterococcus* spp. (47/186=25.3%) and *Escherichia coli* (36/186=19,3%), while in the Tachinidae family 38 isolates were identified, with the highest frequency of a miscellaneous of microorganisms (20/38=52,6%). Here we observed complexity of microorganisms that can be transmitted by Diptera captured in the dairy environment, including mastitis agents from the environmental origin, as well as pathogens of relevance in human health, from the related to infections and toxi-infections of food origin.

**Keywords:** fly microbiota, MALDI-TOF MS, mammary infections in cattle, environmental and contagious pathogens.

## 1. INTRODUÇÃO

São conhecidas mais de 153 mil espécies de dípteros em todo o mundo, compreendidos em 10 mil gêneros e 188 famílias de moscas, mutucas e mosquitos, das quais cerca de 8,7 mil estão amplamente distribuídas em todo território brasileiro (BioSystematic Database of World Diptera- BDWD, 2021).

Os dípteros se caracterizam pela alta capacidade de voo, atingindo até 22 km de distância a partir do ponto de origem. Esta peculiaridade, aliada a alta prolificidade e acesso a ambientes contaminados por micro-organismos, caracteriza os dípteros como potenciais veiculadores de mais de 200 patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários e ovos de helmintos, associados a mais de 65 doenças em humanos e animais (LEVINE e LEVINE, 1991; NAZNI et al., 2005; CASTRO et al., 2008), incluindo enterite, dermatite, conjuntivite e infecções mamárias (BRAVERMAN et al., 1999; FÖRSTER et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014).

Nas fazendas destinadas a criação de vacas leiteiras, o esterco eliminado pelos animais constitui substrato adequado à proliferação de várias espécies de dípteros. Em particular, as espécies *Musca domestica* e *Stomoxys calcitrans* são conhecidas por servirem como vetores de patógenos bacterianos relacionados à mastite bovina, nos quais predominam *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. (ALMEIDA et al., 2014; CASTRO et al., 2013, 2016).

A mastite bovina é a doença que mais onera a criação de vacas destinadas a produção leiteira, em virtude da redução na produção e qualidade do leite e derivados, descarte precoce e aumento na reposição de animais, e gastos com medicamentos e honorários veterinários (GONÇALVES et al., 2018).

Os agentes de mastite bovina são tradicionalmente subdivididos em contagiosos e ambientais, com base na origem ou habitat dos micro-organismos e vias de transmissão. Os patógenos contagiosos são transmitidos comumente entre vacas no momento da ordenha, enquanto os ambientais são veiculados a partir do ambiente contaminado, principalmente nas entre ordenhas (COBIRKA et al., 2020). No entanto, mais recentemente, tem-se observado patógenos de perfil misto, e.g.,

*Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus uberis*, tradicionalmente de origem ambiental, mas com comportamento contagioso nas infecções mamárias em vacas (ZADOKS, 2013; CHENG et al., 2020). Os casos de mastite em animais são classificados também como clínicos e subclínicos. As infecções clínicas se caracterizam por alterações no leite, sinais de inflamação na glândula mamária e, ocasionalmente, até sistêmicas. Nas infecções subclínicas, ocorre somente a redução na produção, sem sinais visíveis de alteração no leite ou nos animais (RUEGG, 2017).

Estudos que compararam rebanhos com e sem controle de dípteros concluíram que houve redução significativa da presença de mastite clínica e subclínica (por *Staphylococcus* spp.), e na redução da contagem células somáticas, após o controle populacional destes insetos, sugerindo que podem ser importantes vetores de micro-organismos causadores de mastite (ARSENOPOULOS et al., 2021).

Apesar da complexidade de espécies de dípteros (BDWD, 2021) e do potencial de transmissão de patógenos para os humanos e animais (NAZNI et al., 2005; FÖRSTER et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014), são escassos os estudos investigando bactérias relacionadas à ocorrência de mastite bovina em dípteros capturados no ambiente de ordenha (CARDOZO et al., 2009; CASTRO et al., 2016). Ainda, a maioria dos estudos envolvendo o diagnóstico de micro-organismos em dípteros, capturados no ambiente de ordenha de vacas, têm firmado o diagnóstico utilizando testes fenotípicos convencionais (ALMEIDA et al., 2014; ALVES et al., 2018).

Neste cenário, o presente estudo investigou a presença de micro-organismos relacionados à mastite em vacas, de origem ambiental ou contagiosa, em dípteros capturados no ambiente de ordenha, utilizando meios convencionais e seletivos no isolamento microbiológico, bem como o diagnóstico em nível de gênero e espécies dos isolados com base na espectrometria de massas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características gerais dos dípteros

Insetos da ordem Díptera pertencem ao filo Arthropoda e classe Insecta. São conhecidas mais de 150 mil espécies pertencentes a mais de 160 famílias, representando de 10 a 15% de toda a biodiversidade mundial. Porém, acredita-se que este número de espécies seja maior do que o conhecido até o momento (CARVALHO et al., 2012). No Brasil, são conhecidas 8.700 espécies, número provavelmente subestimado, devido a elevada riqueza de biomas incluindo áreas inexploradas do país, estimando-se que possa atingir 60.000 espécies (RAFAEL et al. 2009).

No Brasil, devido a grande área geográfica e riqueza linguística, recebem grande variedade de nomes populares, como moscas, mosquitos, mutucas, pernilongos entre outros. Caracterizam-se por apresentarem um par de asas funcionais e membranosas situadas no mesonoto, além de antenas, aparelho bucal picador-sugador ou lambedor, cerdas nas fossetas antenais (denominadas vibrissas). Apresentam metamorfose completa (holometábolos), passando pelas fases de ovo, larva, pupa, imago e adulto (FORTES ELINOR, 2004).

Várias espécies são vetores ou transmissores de micro-organismos relacionados a doenças nos humanos e animais. Dentre essas espécies destacam-se *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*, tanto pela possibilidade de veiculação de patógenos, quanto pela irritação e perda de peso que ocasionam aos bovinos devido ao hábito hematófago das duas últimas espécies (BRITO et al., 2008; RUTZ e GEDEN, 2010). No entanto, várias espécies são consideradas benéficas, pois são polinizadoras, enquanto outras são predadoras atuando no controle populacional de outras espécies de dípteros (NIHEI et al., 2017).

### 2.1.1 Família Muscidae

A família Muscidae possui 5155 espécies conhecidas, apresentando hábitos extremamente variados, incluindo espécies predadoras. Os adultos da maioria das espécies alimentam-se de matéria animal ou vegetal em decomposição. Apresentam alta capacidade de voo, atingindo até 22 km de distância a partir do ponto de origem. *Musca domestica* é a espécie mais conhecida por sua importância médica humana, veterinária e forense (COURI, 1999; PÉREZ e CARVALHO, 2016). Para a medicina veterinária merecem destaque *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans* (Mosca do chifre e Mosca do estabulo, respectivamente) devido serem as pragas hematófagas que mais acarretam prejuízos a pecuária brasileira (ESPINOZA et al., 2021; SOUZA et al., 2021).

### 2.1.2 Família Tachinidae

A família Tachinidae é uma das maiores famílias de dípteros, com 9.622 espécies conhecidas e 1.628 gêneros conhecidos em todo o mundo. As larvas são endoparasitas de outros insetos e os adultos parasitas de herbívoros representando considerável interesse para o controle biológico (STIREMAN et al., 2006; NIHEI et al., 2017).

### 2.1.3 Família Sphaeroceridae

Sphaeroceridae possui 1.555 espécies dispostas em 142 gêneros descritos. Os estágios larvais da maioria das espécies desenvolvem-se em matéria orgânica em decomposição. No estágio adulto são encontrados em grande número em associação com excrementos de mamíferos domésticos. Desse modo são conhecidos popularmente como "mosca-de-fezes" ou "mosca pequena-de-fezes" (ARMORIM et al., 2002; TEPEDINO et al., 2017).

#### **2.1.4 Família Drosophilidae**

Drosophilidae possui 3.944 espécies conhecidas no mundo. As larvas alimentam-se de grande variedade de micro-organismos em secreções de plantas, fungos e matéria orgânica vegetal, como frutas e cactos em decomposição (CARVALHO et al., 2012; MENDES et al., 2021).

#### **2.1.5 Família Sepsidae**

Sepsidae são cosmopolitas, com 375 espécies descritas pertencentes a 38 gêneros. São frequentemente encontrados em fezes e matéria orgânica em decomposição, incluindo carcaças e material vegetal decomposto (ARMORIM et al., 2002).

#### **2.1.6 Família Ulidiidae**

Ulidiidae possuem 671 espécies conhecidas. São saprófaga e em menor frequência fitófagas, podendo ser prejudiciais às plantas (KAMENEVA., 2004).

#### **2.1.7 Família Syrphidae**

Na família Syrphidae são conhecidas 5.905 espécies. Encontradas principalmente em flores, onde obtém néctar e pólen como alimento. Esta família é considerada uma das mais importantes polinizadoras entre os dípteros. Algumas espécies são predadoras de pulgões e larvas de borboletas e mariposas, enquanto outras são prejudiciais a culturas, destruindo bulbos e tubérculos de plantas ornamentais (MARINONI et al., 2007).

#### **2.1.8 Família Calliphoridae**

Na família Calliphoridae são conhecidas 1.526 espécies e 108 gêneros, incluindo as moscas conhecidas popularmente como varejeiras. A maioria das espécies é de importância em humanos e animais, devido a associação com doenças e lesões de pele. As larvas proliferam em matéria orgânica em decomposição ou podem causar miíases em humanos e animais. Os adultos

veiculam patógenos de materiais em decomposição para o ambiente humano e animal (CARVALHO e RIBEIRO, 2000; CARVALHO e MELLO- PATIU, 2008).

### **2.1.9 Família Chloropidae**

A família Chloropidae possui 2.863 espécies pertencentes a 205 gêneros. A maioria é saprófaga ou fitófaga, alimentando-se de grande variedade de plantas ou em matéria orgânica vegetal em decomposição. Podem ser prejudiciais aos humanos e animais, alimentando-se de secreções de feridas ou cavidades naturais. Certas espécies são vetores de bactérias e vírus. (NARTSHUK et al., 2020)

### **2.1.10 Família Sarcophagidae**

Na família Sarcophagidae são descritas 3.073 espécies compreendidas em 355 gêneros. Possuem hábito variado, pois são parasitas de insetos e outros artrópodes. Outras larvas são encontradas em matéria orgânica, e em animais em decomposição, bem como fezes de humanos. Machos de Sarcophagidae frequentemente são encontrados em flores (CARVALHO e MELLO- PATIU, 2008).

### **2.1.11 Família Piophilidae**

Piophilidae possuem 82 espécies conhecidas e agrupadas em 19 gêneros. São conhecidas como mosca-do-queijo ou saltão. As larvas alimentam-se de cadáveres e materiais em decomposição (PAPAVERO e PIMENTEL, 2002).

## **2.3 Dípteros como vetores de patógenos**

Diversos dípteros tem potencial de veiculação de mais de 200 micro-organismos patogênicos, que estão associados a mais de 65 enfermidades em humanos e animais (CASTRO et al., 2008). Podem transportar bactérias nas patas, asas, peças bucais e abdômen. Estima-se que, uma única mosca é capaz de transportar mais de 32 milhões de bactérias no seu corpo ou 200 oocistos de *Cryptosporidium parvum* (JACQUES et al, 2017). Tal fato merece preocupação pois entre 1940 e 2000, as bactérias representaram cerca de 50% dos patógenos

envolvidos nas doenças infecciosas emergentes, das quais 22,8% transmitidas por insetos (JONES et al., 2008).

Os dípteros se alimentam pelo menos duas a três vezes por dia. As fêmeas depositam ovos em material orgânico de qualquer origem animal ou vegetal, que também se constituem em locais de reprodução. A transmissão ocorre quando a mosca estabelece contato com pessoas, animais e alimentos, podendo veicular patógenos relacionados a infecções entéricas, oculares, cutâneas, parasitárias e mamárias bacterianas. O contato geralmente é direto com superfícies externas contaminadas dos dípteros ou os micro-organismos se multiplicam no aparelho digestório e são expelidos pelo regurgitamento e defecação (SARWAR, 2015).

Há crescente interesse em estudos sobre a microbiota associada aos dípteros, que têm demonstrado que as bactérias que colonizam os dípteros são adquiridas principalmente durante a alimentação e reprodução, devido a isso existe uma variação entre as diferentes famílias de dípteros (JUNQUEIRA et al., 2017). As características ambientais dos criadouros explicam também diferentes padrões de bactérias entre as fases larval e adulta. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Lysinibacillus fusiformis*, *Escherichia coli* têm sido frequentemente identificadas na microbiota de dípteros independentemente do local de captura (GUÉGAN et al., 2018).

Diferentes patógenos de importância para saúde humana e animal, já foram isolados em dípteros, incluindo; *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Edwardsiella tarda*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus* (meticilina-resistentes), *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (RAHUMA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2014; ALVES et al., 2018).

Outros patógenos de relevância em saúde humana descritos são: *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter* sp., *Entamoeba* sp., *Giardia* sp., e *Microsporium* sp. Dípteros podem transportar ovos de grande variedade de helmintos dos gêneros *Taenia*, *Ancylostoma*, *Dipylidium*, *Diphyllobothrium*, *Trichuris* e *Ascaris* (SARWAR, 2015).

Espécies das famílias Muscidae e Calliphoridae, geralmente são abundantes próximos a criação de bovinos, devido ao hábito de se alimentar e reproduzir em matéria orgânica, foram associados como veiculadores de *E. coli* O157:H7. Foram observadas, tendência sazonal de infecção de animais e contaminação de alimentos, posto que os dípteros possuem maior atividade durante os meses mais quentes do ano (ALEGBELEYE et al., 2018).

Várias evidências se referem que os dípteros são veiculadores de micro-organismos causadores de mastite em vacas. Em moscas da Família Calliphoridae, foram isolados *E.coli* 33,3% (9/27) e espécies de *Staphylococcus* spp. em 29,6% (8/27). Ambas bactérias são frequentemente encontradas em casos de mastites clínicas e subclínicas em vacas respectivamente. No mesmo estudo foi observado que a maioria das propriedades rurais possuíam criações e aves e suínos próximas as salas de ordenha (ALMEIDA et al., 2014), fato que poderia favorecer a proliferação de insetos.

Isolados de *E. coli* obtidos a partir de *Stomoxys calcitrans* e de quartos mamários bovinos foram submetidos a tipagem molecular, que revelou elevado grau de polimorfismo genético, sugerindo que estes micro-organismos têm uma origem não clonal (CASTRO et al., 2016).

Estudos que compararam rebanhos com e sem controle de dípteros com deltametrina concluíram que no grupo tratado houve redução significativa da presença de mastite clínica e subclínica (por *Staphylococcus* spp.), e na redução da contagem de células somáticas das vacas após o controle populacional de dípteros (ARSENOPOULOS et al., 2018). Em estudo similar com ovelhas leiteiras, a aplicação de deltametrina revelou diminuição de casos mastite provocadas por *Staphylococcus* spp., além redução de células somáticas e das concentrações de cortisol sérico e creatina quinase. Os autores concluíram que o uso de deltametrina favorece o controle das moscas, contribuindo para a redução dos casos de mastite e do bem-estar das ovelhas (ARSENOPOULOS et al., 2021).

ALVES et al. (2018) concluíram que dípteros muscóides capturados em sala de ordenha podem contribuir para a disseminação de isolados de *E. coli* multirresistentes aos antibióticos para os animais.

## 2.5 Reflexos dos dípteros na Saúde Pública

Vários patógenos de origem bacteriana, viral, micótica e ovos de helmintos podem ser veiculados por dípteros (JACQUES et al., 2017). Neste contexto, Moriya et al. (1999), investigaram a origem de surto de infecções por *E. coli* do sorotipo O157:H7 produtora de verotoxina (VTEC) em escola infantil da zona rural do Japão. Foi observada relação clonal entre isolados de *E. coli* obtidas de *M. domestica* capturadas na região e as obtidas de humanos. Ao constatarem que as moscas eram provavelmente provenientes de uma fazenda próxima, sugeriram, pela primeira vez, que a contaminação poderia ter ocorrido pelo contato das moscas com os alimentos ingeridos pelas crianças.

Estudo envolvendo *Stomoxys calcitrans* (mosca do estábulo), encontrou genes de produção de Shiga toxina em 13,63% (8/56) de *E. coli* isoladas a partir da superfície externa desses dípteros coletados nas fazendas leiteiras, alertando para o risco destes insetos na transmissão de bactérias patogênicas (CASTRO et al., 2010).

*Helicobacter pylori* foi identificado em alta prevalência em dípteros das famílias Muscidae e Calliphoridae. Esta bactéria é conhecida por colonizar o estômago dos humanos e causar gastrite, úlceras pépticas e aumento no risco de adenocarcinoma gástrico. Posto que a transmissão de *H. pylori* e a colonização dos humanos não é totalmente compreendida sugere-se que as moscas domésticas podem servir como reservatório do agente (JUNQUEIRA et al., 2017).

Isolados de *Salmonella* sp. podem sobreviver por até quatro semanas em dípteros da família Muscidae, indicando que estes insetos podem contribuir na disseminação do patógeno (MIAN et al., 2002).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerado problema emergente de âmbito mundial. Estudos revelaram que os dípteros também podem ser importantes veiculadores de bactérias patogênicas multirresistentes aos antimicrobianos. Foi identificada em dípteros a presença de *S. aureus* resistentes à colistina, *E. coli* resistentes à tetraciclina e colistina, além de isolados de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. resistentes à penicilina e de *Klebsiella* sp. resistentes a tetraciclina (MOHAMMED et al., 2016). Na Alemanha, Schaumburg et al. (2016) investigaram a resistência aos antimicrobianos em bactérias obtidas de áreas rurais e urbanas da cidade de Münster e compararam aos isolados de

humanos. Em virtude da elevada similaridade dos isolados, sugeriram provável transmissão de bactérias multirresistentes dos dípteros para os humanos.

## 2.2 Dípteros no ambiente de ordenha

Ambientes rurais e urbanos, possibilitam o desenvolvimento de dípteros devido a grande quantidade disponível de matéria orgânica e outros substratos que podem ser utilizados como alimentos. Estrume, matéria orgânica, secreções e sangue de animais são as principais fontes de alimento para larvas e insetos adultos. Os dípteros também têm a capacidade de proliferação em ambientes modificados pelos humanos denominados de sinantropia (CARVALHO et al., 2012; ALVES et al., 2018).

O estrume produzido pelo animais é considerado fonte rentável de nutrientes para outras atividades agrícolas produzidas nas fazendas, mas podem servir de atrativo de dípteros, que carregam grande quantidade de micro-organismos patogênicos relevantes para humanos e animais, incluindo: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., Rotavírus, Coronavírus bovino, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia* sp. foram isolados a partir de estrume não tratado (ALEGBELEYE et al., 2018).

A irritação provocada pelas picadas dos dípteros geralmente interrompe a alimentação normal dos animais e estimula reflexos e comportamentos defensivos (jogar a cabeça, contorcer a pele e a cauda e relutância em pastar). Essa condição estressante, pode reduzir a produção de carne e leite. Algumas espécies como *Haematobia irritans*, *Hydrotaea irritans*, *Stomoxys calcitrans* e *Musca domestica* podem causar também irritações e lesões na pele, principalmente no úbere e nos órgãos genitais. Outras espécies de dípteros, como *Wohlfahrtia magnifica*, *Phormia regina* e *Lucilia cuprina* depositam ovos ou larvas em feridas ativas, causando miíase (ARSENOPOULOS et al., 2021).

Devido ao ambiente propício nas propriedades rurais para a proliferação de dípteros, recomenda-se ações como: evitar depósito de lixo, entulho, esgoto e focos de água parada. Ainda se faz necessário o tratamento dos dejetos, higienização e desinfecção da sala de ordenha e outras dependências dos animais e colocação de iscas físicas e químicas para o controle de pragas (BITTENCOURT., 2012).

## **2.4 Aspectos da etiologia, epidemiologia e controle da mastite bovina.**

Vários autores tem mencionado que dípteros são potencialmente veiculadores de micro-organismos causadores de mastite em vacas (ALMEIDA et al., 2014, CASTRO et al., 2016, ARSENOPOULOS et al., 2018). A mastite bovina é conhecida como doença de etiologia múltipla principalmente de origem bacteriana. Caracteriza-se por alterações físico-químicas e organolépticas no leite, e patológicas no úbere (JAMALI et al., 2018). É a infecção mais frequente dos animais destinados à produção de leite e que mais onera a pecuária leiteira, devido à redução na produção e qualidade do leite, descarte precoce de animais, aumento da reposição de fêmeas e gastos no tratamento e honorários veterinários (GONÇALVES et al., 2018). Ainda, vários patógenos de mastite possuem potencial zoonótico e podem causar infecções e intoxicações após o consumo do leite e derivados, denotando reflexos diretos em saúde única (ZOUHAROVA e RYSANEK, 2008; VIRPARI et al., 2013).

Convencionalmente, a mastite pode ser classificada como clínica e subclínica. Os casos clínicos se caracterizam por sinais de inflamação na glândula mamaria, alterações no leite e, ocasionalmente, até sistêmicas nos animais, bem como mudanças na celularidade, composição físico-química e microbiológica do leite. Em contraste, nas infecções subclínicas é possível notar a redução na produção, além das alterações supracitadas na celularidade, composição físico-química e microbiológica do leite (RUEGG., 2017).

A mastite é causada majoritariamente por agentes de origem bacteriana, embora também pode ser provocada por fungos, leveduras e algas. Os patógenos bacterianos que causam mastite são tradicionalmente classificados como contagiosos ou ambientais, com base no habitat dos agentes e vias de transmissão. As bactérias contagiosas causam predominantemente mastite subclínicas, são transmitidas principalmente entre vacas, e a glândula mamária consiste no reservatório destes patógenos. Em contraste, agentes de origem ambiental causam principalmente mastite clínica, são veiculados para a glândula mamária a partir do solo, barro, fezes e camas dos animais (COBIRKA et al., 2020). Apesar da importância epidemiológica e nas ações de controle/profilaxia baseada nesta classificação, estudos recentes baseados em técnicas de biologia molecular, têm

observado patógenos de perfil misto ou intermediário, como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* (MUNOZ et al., 2007; KLAAS e ZADOCKS., 2018), fato que pode dificultar o controle destes patógenos.

Os principais agentes causadores de mastite contagiosa são espécies de estafilococos, *Streptococcus agalactiae*, corinebactérias e *Mycoplasma* spp. Estes micro-organismos são bem adaptados à multiplicação na glândula mamária, causam geralmente infecções persistentes e subclínicas (RUEGG., 2017). Os patógenos ambientais, são considerados oportunistas, causam usualmente mastite clínica transitória, porém com maior frequência de casos clínicos graves. Entre os ambientais, merecem destaque *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, estreptococos ambientais (exceto *Strep. agalactiae*), fungos e algas (SCHUKKEN et al., 2012; RUEGG., 2017).

As principais medidas gerais de controle e profilaxia da mastite incluem higienização adequada dos utensílios e equipamentos de ordenha, treinamento de ordenhadores, segregação e tratamento dos casos clínicos com base no cultivo microbiológico, testes de sensibilidade microbiana “in vitro”, descarte dos animais com mastite crônica, nutrição adequada dos animais e uso de selantes de tetos no momento da secagem (RIBEIRO et al., 2016; SANTOS E FONSECA., 2019).

Particularmente para agentes ambientais a limpeza diária, descarte de dejetos e matéria orgânica da sala de ordenha e ambientes das entre-ordenhas, uso de pré-dipping, fornecimento de alimento pós-ordenha e manejo adequado da cama dos animais se constituem nas principais ações de controle e profilaxia (RUEGG., 2017). Para agentes contagiosos, a manutenção regular da ordenhadeira, higiene do ordenhador, uso do pós-dipping e terapia da vaca seca representam as principais ações de controle e profilaxia da mastite bovina (RIBEIRO et al., 2016; SANTOS e FONSECA., 2019).

Considerando a complexidade de espécies de dípteros, o potencial de insetos na transmissão de patógenos para humanos e animais, incluindo na mastite bovina, e o reduzido número de estudos investigando agentes de mastite em dípteros capturados no ambiente de ordenha utilizando métodos moleculares no diagnóstico dos patógenos; o presente estudo investigou a ocorrência de

patógenos relacionados a mastite bovina, identificados por espectrometria de massas, em dípteros capturados no ambiente de ordenha.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Identificar a prevalência de patógenos de origem bacteriana de interesse em mastite bovina, diagnosticados por espectrometria de massas, isolados de dípteros capturados em ambientes de ordenha.

#### **3.2 Específicos**

- ✓ Identificar as famílias e/ou espécies dos dípteros capturados;
- ✓ Isolar micro-organismos de interesse em mastite bovina e de potencial zoonótico nos dípteros capturados, utilizando meios de cultivo convencionais e seletivos;
- ✓ Detectar em nível de gênero e/ou espécie agentes causais de mastite bovina, de origem contagiosa ou ambiental, e outros micro-organismos pertencentes à microbiota dos dípteros;
- ✓ Comparar a prevalência de agentes contagiosos ou ambientais de mastite bovina e a classificação entomológica dos dípteros.

### **4.0 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Comissão de Ética**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP), sob o protocolo número CEUA 136/2017.

#### **4.2 Cálculo amostral**

O cálculo amostral foi baseado na prevalência de *E. coli*, posto que é a bactéria mais comumente encontrada em dípteros (ALVES et al., 2018). Para uma

prevalência estimada de isolamento de 17% de *E. coli* (NAZNI et al., 2005; CASTRO et al, 2013; ALMEIDA et al, 2014), com margem de erro de 5% e intervalo de confiança de 95%, seriam necessários coletar 217 dípteros nas fazendas amostradas (24 espécimes por fazenda) (DEAN et al., 2013). O cálculo amostral foi realizado utilizando o programa Open Epi ([https://www.openepi.com/Menu/OE\\_Menu.htm](https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm)) [DEAN et al., 1994].

### 4.3 Características das fazendas

Foram utilizadas nove propriedades leiteiras inclusas no projeto temático FAPESP (2015/19688-8), intitulado “*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp.: Impacto dos fatores de virulência e reflexos na Saúde Pública”, conduzido no Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, sob coordenação do Professor Titular Helio Langoni.

Das propriedades utilizadas seis eram situadas na região sul do Estado de Minas Gerais (propriedades A, B, C, D, E e F) e três no sudoeste do Estado de São Paulo (propriedades H, I e J), que apresentavam condições similares de produção, sanitárias e de manejo similares. A propriedade G do projeto temático foi excluída do presente estudo devido ao impedimento de colheita dos dípteros no ambiente de ordenha. Na seleção das fazendas, foram adotados os seguintes fatores de inclusão: (1) possuir programas de controle de mastite (com registro de dados em softwares de gerenciamento), (2) contagem de células somáticas (CCS) < 400.000 cs/mL (valor adotado para celularidade de vacas pela IN 62- MAPA) (BRASIL, 2011), (3) animais da raça holandesa de alta produção > 20 litros/vaca/dia, (4) mínimo de 200 vacas em lactação e (5) animais em regime de ordenha mecânica e (6) histórico de mastite, (7) ações de controle/profilaxia de mastite (e.g., uso de pré e pós-dipping, descarte de vacas com mastite crônica, ordenha higiênica e manutenção de ordenhadeira mecânica, tratamento de casos clínicos, terapia/profilaxia de vaca seca, teste periódicos de CMT, caneca telada e cultivo microbiano de casos de mastite).

#### **4.4 Colheita e processamento das amostras**

Os dípteros foram coletados de maneira aleatória no ambiente de ordenha (sala de ordenha e entorno, em no máximo de 200 metros) das nove fazendas, dando preferência às moscas que estavam mais próximas aos animais (vacas e bezerros). As coletas foram realizadas entre abril de 2019 a janeiro de 2020.

As capturas foram realizadas com o auxílio de puçá entomológico, previamente desinfetado com solução de hipoclorito de sódio 10%, por 30 minutos, antes da visita nas propriedades. Entre as coletas era aspergido álcool 70% nos puçás, a fim de evitar contaminação cruzada. Os espécimes foram armazenados individualizados em tubos tipo Falcon, transportados em temperatura de refrigeração (4-8°C) em caixas isotérmicas contendo elemento gelado, e estocados no Laboratório de Microbiologia da FMVZ- UNESP, Botucatu, sp, em temperatura de congelamento (-80°C) (ALVES et al., 2018).

Foram capturados 24 insetos em todas as fazendas, exceto em uma, na qual foram capturados 25 espécimes, visando totalizar a amostragem proposta.

#### **4.5 Identificação dos dípteros**

Todos os espécimes de dípteros foram identificados em nível de família, gênero e/ou espécies no Departamento de Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) SP, sob a reponsabilidade da professora de entomologia, Dra. Patrícia J. Thyssen.

A identificação entomológica dos espécimes foi realizada com o auxílio de pinças e placas estéreis, microscópio estereoscópio e chaves taxonômicas específicas para as Ordens (RAFAEL et al.,2012), Famílias (RAFAEL et al.,2012) e espécies de dípteros (CARVALHO e RIBEIRO, 2000.; CARVALHO et al., 2002) e coleoptera (ALMEIDA e MISE, 2009.; RAFAEL et al., 2012;).

#### **4.6 Cultivo bacteriológico**

Após o descongelamento, os espécimes foram transferidos para tubos de vidro esterilizados contendo 3 mL de caldo infusão cérebro e coração (BHI <sup>TM</sup>- Brain Heart Infusion, KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e incubados a 37°C por 12

horas (CASTRO et al, 2016). Após a turvação, alíquotas de 10µL dos meios de BHI contendo os espécimes foram semeadas, simultaneamente, nos meios convencionais de ágar acrescido de sangue bovino (5%) e ágar MacConkey (QUINN et al., 2011). Simultaneamente, alíquotas de 10µL do BHI contendo todos os espécimes foram semeadas em meio seletivo cromogênico comercial (Onfarm SmartColor 2™, Piracicaba- SP, Brasil) para isolamento de agentes de mastite bovina. Ainda, uma alíquota de 30µL do BHI - após turvação - contendo todos os espécimes foram adicionadas em tubos contendo 3mL de caldo EC™ (*Escherichia coli*, KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil), para isolamento seletivo de *E. coli* (ALVES et al., 2018). Todos os meios supracitados foram mantidos em condições de aerobiose, a 37°C, avaliados a cada 24 horas, por 72 horas (QUINN et al., 2011).

As amostras com turvação a partir do caldo EC foram semeadas em ágar MacConkey (ALVES et al, 2018).

#### **4.7 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-TOF MS**

Todos os isolados foram identificados por espectrometria de massas pela técnica de MALDI-TOF MS. Para a identificação de isolados por MADI-TOF MS, foram considerados somente espécimes nos quais foram isoladas cinco ou mais colônias iguais. Os isolados foram submetidos à espectrometria de massas no laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ - USP/Pirassununga, SP, sob a supervisão do professor Titular Marcos Veiga dos Santos.

Para tanto, três a quatro colônias recém isoladas (24 a 48h) em ágar sangue foram submetidas à extração com 20-40µL de ácido fórmico (70%) e centrifugadas, visando a lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de origem ribossomal) e formação de íons, necessários para a formação dos espectros bacterianos. Cerca de 15 minutos depois, foi adicionado em cada amostra 20-40µL de acetomil (100% P.A.) na mesma proporção do ácido fórmico (1:1) e o material centrifugado. Em seguida, 1µL da solução de cada amostra foi adicionada em placas específicas contendo 96 orifícios (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha) e mantidas por cerca de 20 minutos para secar em temperatura ambiente. Em seguida, os orifícios com as amostras secas foram cobertos com 1µL de solução

matriz (ácido 2-ciano-4-hidroxicinâmico diluído a 50% de acetomil e 2,5% de ácido trifluoracético). As placas foram dispostas no receptáculo do equipamento MALDI-TOF MS (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser. Os dados dos espectros foram analisados entre 2.000-20.000m/z, usando o software FlexControl 3.3. A caracterização em nível de gênero e espécie dos isolados foi considerada somente para espectros  $\geq 1.7$  e  $\geq 2.0$ , respectivamente (GONÇALVES et al., 2014).

Os micro-organismos identificados foram agrupados em ambientais e contagiosos para aqueles relacionados com mastite bovina, e miscelânea para aqueles raramente ou nunca identificados na mastite, agentes da microbiota de dípteros ou com relevância em saúde pública.

#### **4.8 Estoque de isolados e dos dípteros**

Após a turvação do meio de BHI, alíquotas de 1,5mL do meio de todos os espécimes de dípteros foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tubos, com adição de glicerol (20%). Após o cultivo microbiológico em meios convencionais e seletivos com caldo BHI, os dípteros foram cuidadosamente retirados dos tubos e estocados em microtubos estéreis (livres de RNA e DNA) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.9 Análise estatística**

As análises de caracterização dos dípteros capturados e da detecção dos micro-organismos foi realizada a prevalência e descritivamente (percentual).

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Identificação dos dípteros**

Foram identificados 215 dípteros e 2 não díptero da família Apidae, totalizando 217 espécimes provenientes de nove diferentes propriedades rurais destinadas a produção leiteira (24 de cada propriedade, exceto propriedade J que obteve 25 espécimes).

Do total de insetos capturados, foram identificados oito gêneros/ espécies pertencentes a 11 diferentes famílias: Muscidae (152/217=70%), Tachinidae (23/217=10,6%), Sphaeroceridae (9/217=4,1%), Drosophilidae (11/217=5%), Sepsidae (4/217=1,8%), Ulidiidae (4/217=1,8%), Syrphidae (4/217=1,8%),

Calliphoridae (2/217=0,9%), Chloropidae (4/217=1,8%), Sarcophagidae (1/217=0,5%) e Piophilidae (1/217=0,5%).

Na família Muscidae, em apenas dois insetos não foram possível a identificação em nível de gênero, enquanto as demais foram identificadas como: *Musca domestica* (126/152=83%), *Atherigona orientalis* (8/152=5,2%), *Brontaea spp.* (8/152=5,2%), *Stomoxys calcitrans* (5/152=3,3%), *Muscina stabulans* (2/152=1,3%) e *Haematobia irritans* (1/152=0,6%).

Os quatro dípteros da família Sepsidae foram do gênero *Euxesta* e o único Sarcophagidae era da espécie *Microcerella halli*. Quanto as demais famílias, não foi possível identificar os dípteros em nível de espécies.

Dentre as famílias de dípteros identificadas 20% (44/217) são consideradas de maior importância fitossanitária, a saber; Tachinidae, Drosophilidae, Ulidiidae, Syrphidae e o não díptero Apidae. As demais famílias são de interesse em medicina veterinária e humana (Muscidae, Sphaeroceridae, Sepsidae, Calliphoridae, Chloropidae, Sarcophagidae e Piophilidae).

## 5.2 Cultivo microbiológico e identificação dos micro-organismos.

Todos os 217 espécimes de insetos foram cultivados. Em 0,9% (2/217) dos espécimes não foram isolados micro-organismos, enquanto 8,7% (19/217) dos espécimes não tiveram nenhum isolado identificado pela espectrometria de massas. Em 90,3% (196/217) dos espécimes foram obtidos no mínimo um isolado identificado pela espectrometria de massas. Em 60,8% (132/217) dos espécimes foi possível identificar um micro-organismo, em 22,11% (48/217) dois micro-organismos e em 7,4% (16/217) entre 3 e 4 micro-organismos, totalizando 275 micro-organismos detectados.

Entre os isolados identificados, os micro-organismos mais prevalentes foram: *Enterococcus spp.* (70/275=25,4%), *Escherichia coli* (49/275=17,8%) e *Staphylococcus sciuri* (25/275=9%) (Tabela 01).

Espécies do gênero *Staphylococcus* foram identificados em 11,6% (32/275). Seguindo destes, seguido de: *Enterobacter spp.* (17/275=6,2%), *Klebsiella spp.* (14/275=5,1%), *Bacillus cereus* (13/275=4,3%), *Pantoea spp.* (12/275=4,3%), *Weissella spp.* (9/275=3,3%), *Acinetobacter spp.* (6/275=2,2%), *Lactococcus spp.*

(6/275=2,2%), *Stenotrophomonas maltophilia* (5/275=2%) e *Pseudomonas* spp. (5/275=2%).

A tabela 1 sumariza a prevalência dos micro-organismos identificados e agrupados em agentes contagiosos ou ambientais de mastite bovina e miscelânea.

**Tabela 1:** Prevalência de micro-organismos de interesse em mastite, identificados em dípteros capturados no ambiente de ordenha, diagnosticados por MALDI-TOF MS\* (2019-2020).

	Micro-organismo	N/Total de isolados(%)
Ambientais	<i>Enterococcus</i> spp.	70/275 (25,4%)
	<i>Escherichia coli</i>	49/275 (17,8%)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/275 (4,0%)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7/275 (2,5%)
	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	6/275 (2,1%)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Pseudomonas fulva</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Escherichia hermannii</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Proteus mirabilis</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Klebsiella variicola</i>	3/275 (1,9%)
	<i>Escherichia vulneris</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Escherichia fergusonii</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1/275 (0,4%)
	subtotal	166/275 (60,4%)
Contagiosos	<i>Staphylococcus sciuri</i>	25/275 (9,0%)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Staphylococcus choromogenes</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Staphylococcus simulans</i>	1/275 (0,4%)
	subtotal	32/275 (11,6)
Miscelânea	<i>Bacillus cereus</i>	13/275 (4,3%)
	<i>Pantoea</i> spp.	12/275 (4,3%)
	<i>Weissella</i> spp.	9/275 (3,3%)
	<i>Acinetobacter</i> spp.	6/275 (2,2%)
	<i>Lactococcus</i> spp.	6/275 (2,2%)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5/275 (2%)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Bacillus megaterium</i>	3/275 (1%)
	<i>Lysinibacillus</i> spp.	3/275 (1%)
	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	3/275 (1%)
	<i>Ochorobactrum intermedium</i>	3/275 (1%)
	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Comamonas kerstersii</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Kurthia gibsonii</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Pluribacter pyrinus</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Bacillus oleronius</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Candida rugosa</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Trichosporon asahii</i>	1/275 (0,4%)
	subtotal	77/275 (28%)
	Total geral	275 (100%)

\* Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight = MALDI-TOF; N = frequência dos isolados, número total de isolados (%).

### 5.3 Distribuição dos micro-organismos de interesse em mastite bovina;

#### 5.3.1 Ambientais

Micro-organismos de origem ambiental relacionados a mastite bovina foram prevalentes nos dípteros (166/275=60,4%), com maior frequência de detecção de: *Enterococcus* spp. (70/275=25,4%), *Escherichia coli* (49/275=17,8%) e *Enterobacter* spp. (17/275=6,2%). Grande variedade de *Enterococcus* foram identificados, incluindo: *E. faecalis* (29/70=41%), *E. faecium* (27/70=38,6%), *E. hirae* (04/70=5,7%), *E. casseliflavus*. (03/70=4%), *E. sulfureus* (01/70=1%), *E. durans* (02/70=3%), *E. gallinarum* (02/70=3%), *E. avium* (01/48=1%) e *E. thailandicu* (01/48=1%).

Outras enterobactérias foram identificadas, a saber: *Klebsiella* spp. (14/275=5,1%), *Pseudomonas* spp. (5/275=2%), *Proteus mirabilis* (4/275=1,4%), *Escherichia hermani* (4/275=1,4%), *Escherichia vulneris* (2/275=1,9%) e *Escherichia fergusonii* (1/275= 0,4%).

#### 5.3.2 Miscelânea

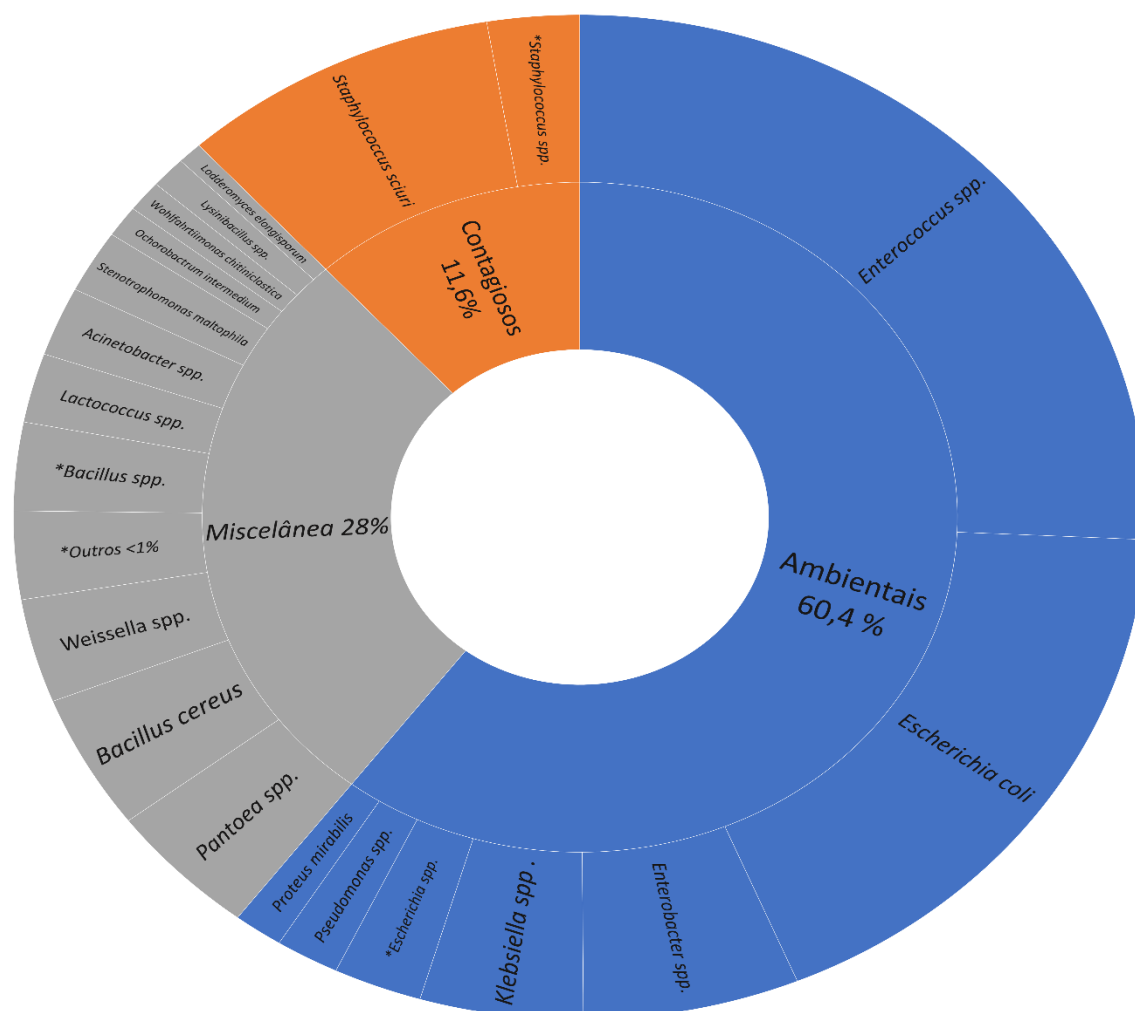
Os micro-organismos agrupados em miscelânea foram a segunda categoria de agentes mais frequentes (77/275=28%). Foram identificadas 20 espécies de micro-organismos com predomínio: *Bacillus cereus* (13/275=4,7%), *Pantoea* spp. (12/275= 4,3%) e *Weissella* spp. (9/275=3,3%).

Outros micro-organismos identificados neste grupo pertenciam aos gêneros, *Acinetobacter*, *Lysinibacillus* e *Lactococcus*, além de isolados da espécie *Stenotrophomonas maltophila*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Loddoromyces elongisporus*, *Ochorobactrum intermedium*, *Arthrobacter gandavensis*, *Comamonas kerstersii*, *Kurthia gibsonii*, *Pluribacter pyrinus*, *Wolhfahrtimonas chitinoclastica*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus oleronius*, *Candida rugosa* e *Trichosporon asahii*. Neste grupo merecem destaque patógenos associados à infecções e intoxicações em humanos, como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Acinetobacter* spp., *Ochorobactrum intermedium* e *Comamonas kerstersii*.

### 5.3.3 Contagiosos

Os agentes, isolados dos dípteros, relacionados à mastite bovina de origem contagiosas (32/275=11,6%) foram identificados em menor frequência. Apenas espécies de estafilococos foram detectados, com predominância de *Staphylococcus sciuri* (25/275=9%) seguido em menor frequência por: *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. choromogenes*, *S. xylosus* e *S. simulans*. A figura 1 mostra a distribuição de micro-organismos de origem ambiental e contagiosa relacionados a mastite bovina, e outros micro-organismos identificados (miscelânea) em dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas.

**Figura 1:** Distribuição de agentes de origem ambiental e contagiosa relacionados a mastite bovina, e outros micro-organismos (miscelânea) isolados de dípteros capturados no ambiente de ordenha de vacas.



\**Staphylococcus spp.*: *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. choromogenes*, *S. xylosus* e *S. simulans*. *Bacillus spp.*: *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. oleronius*. *Escherichia spp.*: *E. hermannii*, *E. vulneris* e *E. fergusonii*. *Outros <1%*: *A. gandavensis*, *C. kerstersii*, *K. gibsonii*, *P. pyrinus*, *A. faecalis*, *C. rugosa* e *T. asahii*.

#### 5.4 Relação entre dípteros e identificação microbiana com ênfase em agentes de mastite bovina

A família Muscidae foi prevalente nos dípteros capturados, com maior número de isolados identificados (152/217=70%), dos quais 66,1% (123/186) foram ambientais, 23% (43/186) miscelânea e 10,7% (20/186) contagiosos. Na espécie *Musca domestica* foram obtidos 156 isolados, dos quais 66,6% (104/156) eram ambientais, 23% (36/156) miscelânea e 10,2% (16/156) contagiosos. Os três micro-organismos prevalentes nos dípteros foram *Enterococcus* spp. (47/156=30%), *Escherichia coli* (30/156=19,2%) e *Staphylococcus sciuri* (12/156=7,7%). Nas demais espécies identificadas pertencentes a família Muscidae foram obtidos 27 isolados com predominância de; *Enterococcus* spp. (7/27=26%), *Escherichia coli* (6/27=22%) e *Klebsiella* spp. (5/27=13%).

Tachinidae foi a segunda família com maior número de dípteros (23/217=10,6%), dos quais foram obtidos 38 isolados de micro-organismos identificados como miscelânea (20/38=52,6%), ambientais (12/38=31,5%) e contagiosos (6/38=15,7%). Os micro-organismos mais frequentes foram *Weissella* spp. (5/38=13%), *Staphylococcus sciuri* (4/38=10,5%) e *Escherichia coli* (5/38=13%). Somente na família de Tachinidae foram identificados fungos das espécies *Candida rugosa* (1/38=2,6%) e *Trichosporon asahii* (1/38=2,6%).

A família Drosophilidae foram obtidos 16 isolados de 11 espécimes de dípteros (11/217=5%), com predomínio de *Staphylococcus* spp. (5/16=31,2%).

Nas outras nove famílias (Sphaeroceridae, Sepsidae, Ulidiidae, Syrphidae, Calliphoridae, Chloropidae, Sarcophagidae, Piophilidae e Apidae) foram obtidos 35 isolados de 31 espécimes de dípteros. Na família Sphaeroceridae foi obtido um isolamento de *Staphylococcus sciuri* enquanto nas demais oito famílias não foram identificados micro-organismos contagiosos. Nestas nove famílias, os micro-organismos mais frequentes foram *Enterococcus* spp. (11/35=31%), *E.coli* (6/35=17%) e *Enterobacter* spp. (5/35=14%), com predominância de ambientais (26/35=74%).

A tabela 2 sumariza a classificação entomológica dos dípteros capturados e os micro-organismos identificados por espectrometria de massas, com ênfase nos agentes contagiosos e ambientais relacionados a mastite.

- 1 **Tabela 2:** Identificação entomológica de famílias, gêneros e/ou espécies de dípteros capturados em ambiente de ordenha de  
 2 vacas seguido dos micro-organismos de interesse em mastite 2019-2020.

Família Dípteros	Díptero identificados por família N/Total(%)	Espécies de dípteros	Espécies de dípteros identificadas por família N/Total(%)	Ambientais	N/ Total de isolados por espécie de dípteros (%)	Contagiosos	N/ Total de isolados por espécie de dípteros (%)	Miscelânea	N/ Total de isolados por espécie de dípteros (%)
Muscidae	152/217 (70%)	<i>Musca domestica</i>	126/152 (83%)	<i>Enterococcus</i> spp.	47/156 (30,1%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	12/156 (7,7%)	<i>Bacillus cereus</i>	8/156 (5,1%)
				<i>Escherichia coli</i>	30/156 (19,2%)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2/156 (1,2%)	<i>Weissella</i> spp.	3/156 (1,9%)
				<i>Enterobacter cloacae</i>	6/156 (3,8%)	<i>Staphylococcus simulans</i>	1/156 (0,6%)	<i>Lactococcus</i> spp.	3/156 (1,9%)
				<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	4/156 (2,5%)	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1/156 (0,6%)	<i>Bacillus</i> spp.	3/156 (1,9%)
				<i>Escherichia hermanii</i>	4/156 (2,5%)			<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2/156 (1,2%)
				<i>Escherichia vulneris</i>	2/156 (1,2%)			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2/156 (1,2%)
				<i>Proteus mirabilis</i>	3/156 (1,9%)			<i>Arthrobacter gandavensis</i>	1/156 (0,6%)
				<i>Pseudomonas fulva</i>	1/156 (0,6%)			<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1/156 (0,6%)
				<i>Klebsiella variicola</i>	2/156 (1,2%)			<i>Acinetobacter baylyi</i>	1/156 (0,6%)
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4/156 (2,5)			<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2/156 (1,2%)
				<i>Escherichia fergusonii</i>	1/156 (0,6%)			<i>Pantoea</i> spp.	6/156 (3,4%)
								<i>Alcaligenes faecalis</i>	1/156 (0,6)
								<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	3/156 (1,9)
					104/156 (66,6%)		16/156 (10,2%)		36/156 (23%)
		<i>Atherigona orientalis</i>	8/152 (5,2%)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2/7 (28,6%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/7 (14,3%)	<i>Bacillus cereus</i>	1/7 (14,3%)
				<i>Escherichia coli</i>	1/7 (14,3%)			<i>Ochrobactrum grignonense</i>	1/7 (14,3%)
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/7 (14,3%)				
					4/7 (57,1%)		1/7 (14,3%)		2/7 (28,6%)
		<i>Brontaea</i> sp.	8/152(5,2%)	<i>Escherichia coli</i>	3/10 (30%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/10 (10%)	<i>Comamonas kerstersii</i>	1/10 (10%)
				<i>Enterococcus</i> spp	4/10 (40%)			<i>Pantoea ananatis</i>	1/10 (10%)
					7/10(70%)				2/10 (20%)
		<i>Stomoxys calcitrans</i>	5/152 (3,3%)	<i>Escherichia coli</i>	1/5 (20%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/5 (20%)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1/5 (20%)
				<i>Enterobacter cloacae</i>	1/5 (20%)				
				<i>Enterococcus faecium</i>	1/5 (20%)				
					3/5 (60%)		1/5 (20%)		1/5 (20%)
		<i>Muscina stabulans</i>	2/152 (1,3%)	<i>Enterococcus faecium</i>	1/2 (50%)			<i>Acinetobacter</i> spp.	1/2 (50%)
		<i>Haematobia irritans</i>	1/152 (0,6%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (100%)				
		sp. (Não identificado)	2/152 (1,3%)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/5 (20%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/5 (20%)	<i>Pluralibacter pyrinus</i>	1/5 (20%)
				<i>Enterococcus faecalis</i>	1/5 (20%)				
				<i>Escherichia coli</i>	1/5 (20%)				
					3/5 (60%)		1/5 (20%)		1/5 (20%)
		<b>Total isolados por família de dípteros</b>		Ambientais	123/186 (66,1%)	Contagiosos	20/186 (10,7%)	Miscelânea	43/186 (23,1%)

3

4 N = frequência dos dípteros e isolados/Número total de dípteros e isolados (%)

5

Tachinidae	23/217 (10,6%)		<i>Escherichia coli</i>	5/38 (13,1%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	4/38 (10,5%)	<i>Weissella</i> spp.	5/38 (13,1%)
			<i>Enterococcus</i> spp.	3/38 (7,9%)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1/38 (2,6%)	<i>Pantoea</i> spp.	3/38 (7,9%)
			<i>Pseudomonas fulva</i>	1/38 (2,6%)	<i>Staphylococcus xylosum</i>	1/38 (2,6%)	<i>Acinetobacter</i> spp.	3/38 (7,9%)
			<i>Pseudomonas monteilii</i>	1/38 (2,6%)			<i>Bacillus cereus</i>	2/38 (5,3%)
			<i>Proteus mirabilis</i>	1/38 (2,6%)			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2/38 (5,3%)
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1/38 (2,6%)			<i>Lactococcus</i> spp.	2/38 (5,3%)
							<i>Bacillus licheniformis</i>	1/38 (2,6%)
				<i>Candida rugosa</i>	1/38 (2,6%)			
				<i>Trichosporon asahii</i>	1/38 (2,6%)			
			12/38 (31,5%)	6/38 (15,7%)				
Drosophilidae	11/217 (5%)		<i>Enterococcus</i> spp.	2/16 (12,5%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	4/16 (25%)	<i>Bacillus cereus</i>	2/16 (12,5%)
			<i>Escherichia coli</i>	2/16 (12,5%)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1/16 (6,28%)	<i>Pantoea agglomerans</i>	1/16= (6,28%)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/16 (6,25%)			<i>Bacillus licheniformis</i>	1/16= (6,28%)
							<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1/16= (6,28%)
						<i>Bacillus megaterium</i>	1/16= (6,28%)	
			5/16 (31,2%)	5/16 (31,2%)				
Sphaeroceridae	9/217 (4,1%)		<i>Enterococcus</i> spp.	5/9 (55,5%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/9 (11,1%)	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1/9 (11,1%)
			<i>Pseudomonas fulva</i>	1/9 (11,1%)			<i>Weissella cibaria</i>	1/9 (11,1%)
				6/9 (66,7%)		1/9 (11,1%)		2/9 (22,2%)
Sepsidae	4/217 (1,8%)		<i>Escherichia coli</i>	2/5 (40%)			<i>Acinetobacter junii</i>	1/5 (20%)
			<i>Enterococcus</i> spp.	2/5 (40%)				
			4/5 (80%)				1/5 (20%)	
Ulidiidae	4/217 (1,8%)	<i>Euxesta</i> sp.	<i>Klebsiella varicola</i>	1/5 (20%)			<i>Kurthia gibsonii</i>	1/5 (20%)
			<i>Escherichia coli</i>	1/5 (20%)			<i>Bacillus licheniformis</i>	1/5 (20%)
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1/5 (20%)				
				3/5 (60%)				2/5 (40%)
Syrphidae	4/217 (1,8%)		<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2/6 (33,3%)			<i>Lactococcus lactis</i>	1/6 (16,7%)
			<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/6 (16,7%)			<i>Pantoea agglomerans</i>	1/6 (16,7%)
			<i>Enterococcus faecalis</i>	1/6 (16,7%)				
				4/6 (66,7%)				2/6 (33,4%)
Chloropidae	4/217 (1,8%)		<i>Pseudomonas fulva</i>	1/4 (25%)				
			<i>Escherichia coli</i>	3/4 (75%)				
				4/4 (100%)				
Calliphoridae	2/217 (0,9%)		<i>Enterobacter cloacae</i>	1/2 (50%)				
			<i>Enterococcus faecalis</i>	1/2 (50%)				
				2/2 (100%)				
Não diptero (Apidae)	2/217 (0,9%)					<i>Bacillus licheniformis</i>	1/1 (100%)	
Sarcophagidae	1/217 (0,5%)	<i>Microcerella halli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	1/2 (50%)				
			<i>Enterococcus faecalis</i>	1/2 (50%)				
				2/2 (100%)				
Piophilidae	1/217 (0,5%)		<i>Enterococcus faecalis</i>	1/1 (100%)				
<b>Total de Isolados</b>			Ambientais	166/275 (60,4%)	Contagiosos	32/275 (11,6%)	Miscelânea	77/275 (28%)

Quando os dípteros são separados em dois grupos, aqueles de importância fitossanitária (Tachinidae, Drosophilidae, Ulidiidae, Syrphidae e o não díptero Apidae) e aqueles de importância em medicina veterinária e humana (Muscidae, Sphaeroceridae, Sepsidae, Calliphoridae, Chloropidae, Sarcophagidae e Piophilidae), observa-se que no primeiro grupo 46,15% dos micro-organismos eram miscelânea e no segundo grupo 67,8% eram ambientais.

### 5.5 Prevalência de micro-organismos por fazenda.

Ocorreram diferenças entre a família de díptero mais frequente e entre os micro-organismos mais frequentes conforme a fazenda onde os espécimes foram capturados. Os dados foram apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Prevalência de famílias de dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas seguido dos micro-organismos de maior prevalência de interesse em mastite correlacionados com as fazendas onde ocorreram as capturas 2019-2020.

Fazenda	Díptero Prevalente	Micro-organismos prevalentes
A	Muscidae 13/24= 54,2%	<i>Staphylococcus sciuris</i> (13/49= 26,5%) <i>Enterococcus</i> spp. (9/49= 18,4%)
B	Tachinidae 15/24= 62,5%	<i>Enterococcus</i> spp. (5/36= 14%) <i>E.coli</i> (4/36= 11%)
C	Muscidae 19/24= 79%	<i>E.coli</i> (6/26= 23%) <i>Staphylococcus sciuri</i> (4/26= 15,8%)
D	Muscidae 19/24= 79%	<i>Enterococcus</i> spp. (5/20= 25%) <i>E.coli</i> (4/20= 20%)
E	Muscidae 16/24= 66,6%	<i>E.coli</i> (13/33= 39%) <i>Enterococcus</i> spp. (6/33= 18%)
F	Muscidae 23/24= 95,8%	<i>Enterococcus</i> spp. (10/26= 40%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (5/26= 19%)
H	Muscidae 21/24= 87,5%	<i>Enterococcus</i> spp. (12/27= 44,4%) <i>E.coli</i> (10/27= 37%)
I	Muscidae 21/24= 87,5%	<i>Enterococcus</i> spp. (15/31= 48,4%) <i>Enterobacter</i> spp. (7/31= 22,5%)
J	Muscidae 14/25= 56%	<i>Enterococcus</i> spp. (8/26= 30,8%) <i>Enterobacter</i> spp. (5/26= 19,2%)

## 6. Discussão

Elevada complexidade de micro-organismos isolados de dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas foi observada no presente estudo, com predomínio de enterobactérias relacionadas a mastite bovina de origem ambiental, bem como patógenos da microbiota dos insetos ou associados com infecções oportunistas e toxi-infecções em humanos.

São conhecidas mais de 150 mil espécies de dípteros (BDWD, 2021). Estes insetos se caracterizam por alta capacidade de voo, prolificidade e acesso a ambientes contaminados, que podem favorecer a veiculação de patógenos de origem bacteriana, parasitária, viral e ovos de parasitos, potencialmente infectantes para animais e humanos (NAZNI et al., 2005), incluindo para a glândula mamária de vacas (CASTRO et al., 2013,2016). Apesar da grande diversidade de micro-organismos encontrados no presente estudo, somente oito gêneros/espécies pertencentes à 11 famílias de dípteros - e uma de não dípteros - foram entomologicamente classificados, fato que poderia ser creditado à elevada complexidade das peculiaridades anatômicas utilizadas para a classificação destes insetos (CARVALHO et al., 2002; RAFAEL et al., 2012), bem como o não reconhecimento ainda de vários gêneros/espécies, fato que poderia ser considerado limitação do presente estudo.

Dípteros da família Muscidae foram predominantes entre os insetos capturados. Tal achado poderia ser creditado à proximidade destes insetos dos animais domésticos, devido ao hábito alimentar hematófago, ou de consumo de matéria orgânica (RAFAEL et al. 2009), abundante nos ambientes da ordenha das vacas e entorno.

*Musca domestica*, díptero bem conhecido da família Muscidae, foi a espécie mais frequentemente identificada nos dípteros capturados. Estudos similares também têm descrito a elevada ocorrência deste inseto (ALMEIDA et al. 2014.; ARSENOPOULOS et al. 2018), provavelmente pelas características de sinantropismo e alto potencial biótico, quando comparada às demais espécies de dípteros (CASTRO et al. 2008).

A microbiota corpórea dos dípteros está intimamente relacionada com os hábitos alimentares e de reprodução podendo ser, convencionalmente, subdividida em dípteros com envolvimento fitossanitário ou de interesse em animais e/ou humanos (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018). No presente estudo, nas famílias com maior interesse em animais (Muscidae, Sphaerocidae, Sepsidae, Ulidiidae, Chloropidae, Calliphoridae, Sarcophagidae, Piophilidae) foi identificado predomínio de enterobactérias, incluindo descritas na gênese de casos de mastite ambiental (SHUKKEN et al., 2012; RUEGG, 2017). Em contrapartida, nas famílias com maior interesse fitossanitário (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018)

foram encontrados com maior frequência agentes classificados como miscelânea (*Tachinidae*, *Drosophilidae*, *Ulidiidae* e *Syrphidae*), embora neste grupo tenham sido incluídos os agentes relacionados às infecções e toxi-infecções alimentares em humanos. Apesar desta tendência, no presente estudo os grupos foram comparados de maneira descritiva, posto que não foram capturados espécimes suficientes - de cada família - com objetivo de comparar as famílias de dípteros. JUNQUEIRA et al. (2017) compararam a microbiota dos dípteros *Chrysomya megacephala* e *Musca domestica*, ambos sinantrópicos, de ambientes rurais, urbanos e naturais, e descreveram certas diferenças na identificação dos micro-organismos da microbiota conforme o habitat dos insetos. No entanto, posto que as duas espécies de dípteros possuíam os mesmos hábitos de reprodução e alimentação, apresentaram microbiota semelhante. Com efeito, a variação da microbiota corpórea dos dípteros sofre influência direta conforme os hábitos da espécie e condições do ambiente (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018).

A mastite bovina é a doença que mais onera a criação de vacas destinadas a produção leiteira (SANTOS e FONSECA, 2019). Os agentes de mastite bovina são convencionalmente subdivididos em contagiosos e ambientais, com base no habitat dos micro-organismos e formas de transmissão. Os patógenos contagiosos como estafilococos, estreptococos, corinebactérias e micoplasmas são transmitidos comumente entre vacas no momento da ordenha e estão associados principalmente com a mastite subclínica, de evolução crônica ou persistente. Em contraste, os agentes ambientais, *i.e.*, enterobactérias, fungos, algas e certos actinomicetos e estreptococos, são veiculados para a glândula mamária a partir do solo, terra, água, vegetação e cama dos animais, geralmente associados a casos clínicos de mastite, de curta duração, por vezes de elevada gravidade (SHUKKEN et al., 2012; RUEGG., 2017).

Diferentes espécies de *Enterococcus* (25,4%) e *Escherichia coli* (17,8%) - conhecidos micro-organismos do grupo das enterobactérias - foram os agentes mais frequentemente detectados nos dípteros capturados nos ambientes de ordenha de nove fazendas amostradas no presente estudo, com histórico de casos de mastite clínica. Tal predomínio de enterobactérias e outras bactérias gram-negativas, no presente estudo, poderia ser justificado pelos hábitos de reprodução e alimentação (de matéria orgânica) e contato com fezes e outros dejetos (RAFAEL

et al., 2009), abundantes no ambiente de ordenha e entorno, que poderiam favorecer a presença deste grupo de agentes na região corpórea externa dos dípteros capturados.

O habitat principal das enterobactérias, fungos e algas relacionadas a mastite é o ambiente das vacas, particularmente fezes, solo, barro, água, cama dos animais e matéria orgânica (esterco, urina), no qual predominam também espécies de dípteros sinantrópicos, como os capturados no presente estudo. Ainda, moscas adultas podem albergar bactérias na superfície corporal adquiridas na fase larval, bem como a ovopostura é realizada na própria matéria orgânica (SCHUSTER et al., 2013). Tais fatos poderiam justificar a elevada frequência das enterobactérias nos dípteros capturados no ambiente de ordenha nas fazendas amostradas (ALMEIDA et al., 2014.; CASTRO et al., 2016), bem como a necessidade de manejo e higiene do ambiente de ordenha e entre-ordenhas, visando evitar a proliferação de dípteros que possam ser potencialmente veiculadores de patógenos ambientais para a glândula mamária das vacas, usualmente associados com casos clínicos de mastite, por vezes de alta gravidade (SHUKKEN et al., 2012; RUEGG, 2017).

Além do ambiente, as espécies de *Enterococcus* também são encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais. Esse grupo de micro-organismos - de origem ambiental - é considerado oportunista nas infecções em animais e humanos, bem como multirresistentes aos antimicrobianos convencionais (GAO et al., 2019), incluindo espécies isoladas de dípteros (AKHTAR et al., 2009).

No presente estudo, espécies de *Enterococcus* representaram o gênero de micro-organismo mais frequentemente encontrado nos insetos capturados no ambiente de ordenha. Em contraste, estudo similar no Brasil envolvendo a identificação de bactérias de moscas de ambiente de ordenha encontrou baixa ocorrência do gênero *Enterococcus* (0,62%) (CASTRO et al, 2008), utilizando meios convencionais (ágar sangue) e bioquímicos de identificação microbiana. Tal divergência de resultados poderia ser justificada pela utilização de meios seletivos no presente estudo, como o caldo EC e - de modo adaptado - o meio cromogênico tripartido Onfarm SmartColor 2™, este último idealizado para o diagnóstico no leite de agentes específicos de mastite bovina, no próprio ambiente da fazenda, com objetivo de facilitar a tomada de decisões de tratamento e/ou controle (GRANJA et al., 2021). O uso dos meios seletivos supracitados, pode ter favorecido o isolamento

de enterobactérias relacionadas a mastite bovina. Ainda, no presente estudo, o diagnóstico dos agentes foi realizado por espectrometria de massas, que apresenta elevada especificidade na detecção em nível de gênero e espécies bacterianas, incluindo relacionadas à mastite bovina (GONCALVES et al., 2014). Neste contexto, certas espécies de *Enterococcus* apresentam similaridade fenotípica com espécies de estreptococos (*S. dysgalactiae* e *S. uberis*), fato que pode levar ao subdiagnóstico de espécies de *Enterococcus* utilizando métodos não-moleculares de identificação (BRAGA et al., 2018).

Paralelamente, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* têm sido prevalentes em infecções intramamárias bovina causadas por este gênero de enterobactéria (GUIMARÃES et al., 2020; YOON et al., 2021). De modo similar, no presente estudo 80% dos isolados do gênero *Enterococcus* pertenciam as estas duas espécies, indicando que os dípteros podem ser importantes veiculadores destas espécies de patógenos relacionados à mastite clínica em vacas, de origem ambiental.

*Escherichia coli* pertence a microbiota intestinal de humanos e animais. São micro-organismos amplamente encontrados no meio ambiente, associados a infecções entéricas e extraentéricas oportunistas em humanos e animais, caracterizados por elevada complexidade de fatores de virulência (RIBEIRO et al., 2016). Em bovinos, é a principal enterobactéria envolvida em casos de mastite clínica, de origem ambiental, por vezes de elevada gravidade (GUERRA et al., 2020).

Nas fazendas amostradas, *E. coli* foi o segundo micro-organismo mais frequente (17,8%), concordando com os achados de outros estudos, que também realizaram isolamento do agente a partir de dípteros de ambiente de ordenha (NAZNI et al., 2005; CASTRO et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014). Castro e colaboradores (2013) identificaram a presença de genes produtores de Shiga-toxina (STEC) em 13% de isolados de *E. coli* obtidos a partir de dípteros capturados ao redor de sala de ordenha, revelando também risco ocupacional em Saúde Pública da presença destes insetos no ambiente de ordenha de vacas.

Além de *E. coli*, outras espécies do gênero *Escherichia* foram detectadas nos dípteros do presente estudo, a saber: *E. hermannii*, *E. vulneris* e *E. fergusonii*. Estas espécies têm sido identificadas em infecções ocasionais em humanos, como

bacteremias, infecções do trato urinário, encefalites e sepse (IOANNOU, 2019). Apesar da patogenicidade pouco conhecida em animais domésticos, estas espécies já foram detectadas em baixa prevalência em casos de mastite clínica bovina, quando utilizados métodos moleculares no diagnóstico, como MALDI-TOF ou sequenciamento genético (GUTIÉRREZ-CHÁVEZ et al., 2016.; JAHAN et al., 2021).

Espécies de *Klebsiella*, particularmente *Klebsiella pneumoniae*, se constituem de outro grupo de micro-organismos também encontrados no solo, esterco e cama dos animais, relacionados a grande variedade de infecções em animais domésticos (RIBEIRO et al., 2022) e em humanos. Nos bovinos, são conhecidos agentes primários de mastite clínica, usualmente com sinais sistêmicos (COBIRKA et al. 2020.; RIBEIRO et al., 2022). Neste contexto, em rebanhos da China, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* foram as espécies mais frequentemente isoladas de casos clínicos de mastite bovina (CHENG et al., 2020). Paralelamente, no presente estudo estas espécies foram as mais frequentes, indicando que os dípteros podem ser potenciais veiculadores destes patógenos no ambiente de ordenha de vacas (ALMEIDA et al., 2014). Vale ressaltar que, apesar das espécies de *Klebsiella* serem classicamente conhecidas como agentes de mastite ambiental, tem-se observado - com o uso de métodos moleculares - perfil binário do patógeno, *i.e.*, comportamento contagioso nos rebanhos; fato que pode representar novo desafio nas abordagens de controle e prevenção da mastite bovina por espécies de *Klebsiella* (KLAAS e ZADOCKS., 2018).

Além de *E. coli* e espécies de *Enterococcus* e *Klebsiella* foram identificadas no presente estudo outras bactérias gram-negativas oportunistas, de origem ambiental relacionadas à casuística de mastite em vacas, *e.g.*, espécies de *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Proteus*. Este achado concorda com estudos conduzidos no Brasil (CASTRO et al., 2008), que também investigaram a presença de enterobactérias e outras bactérias gram-negativas na região corpórea de dípteros capturados em ambientes de ordenha, reforçando o risco de veiculação pelos dípteros deste grupo de bactérias relacionadas a mastite clínica bovina.

*Trueperella pyogenes* são bactérias conhecidas em infecções mamárias em vacas, de comportamento oportunista, denominadas de “mastite de verão”, devido ao aumento da casuística em períodos de altas temperaturas e pluviosidade, que

favorecem a proliferação de dípteros nos ambientes de ordenha (RIBEIRO et al., 2015). Com base nestas características, seria esperado o isolamento deste patógeno nas fazendas amostradas, embora nenhum isolado de *T. pyogenes* tenha sido detectado nos dípteros capturados. A ausência de isolamento de *T. pyogenes* em dípteros de ambientes de ordenha também foi referido em estudo similar na Grécia (ARSENOPOULOS et al., 2018), reforçando que a microbiota corpórea dos dípteros está intimamente associada com as condições ambientais e reprodutivas (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018), ou mesmo da presença de determinadas espécies de dípteros (CHIRICO et al., 1997).

No presente estudo foram identificados nos dípteros agentes contagiosos - relacionados a mastite bovina - em menor ocorrência se comparados aos microorganismos de origem ambiental. Nas nove fazendas amostradas foram identificados exclusivamente espécies de estafilococos relacionadas a casuística de mastite bovina (DUFOUR et al., 2012), com predomínio de *S. sciuri*. Curiosamente, não foram detectados isolados de *Staphylococcus aureus*. Em contraste, *S. aureus* foi encontrado em alta frequência em estudos similares (RAHUMA et al., 2005, BOUAMAMAA et al., 2010; GHALEHNOO., 2015). Tal resultado pode encontrar justificada nas diferenças dos métodos de diagnóstico utilizados, das características de ambiente e manejo dos animais nas diferentes regiões estudadas, em particular no controle de *S. aureus*, posto que as fazendas amostradas do presente estudo eram de alta qualidade, com programas rígidos de controle e descarte de animais cronicamente infectados, incluindo por este patógeno.

Ao contrário dos ambientais, os patógenos contagiosos são transmitidos comumente entre vacas no momento da ordenha, a partir do equipamento de ordenha ou pelos ordenhadores, relacionados principalmente a infecções subclínicas e persistentes (RUEGG., 2017). Todas as espécies de estafilococos isoladas dos dípteros do presente estudo já foram identificadas causando mastite em vacas em outros países, quais sejam *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus* (ABERA et al., 2013; SONG et al., 2020) e no Brasil (CASTRO et al., 2008.; ALMEIDA et al., 2014). Assim, a detecção de agentes relacionados a mastite contagiosa nos dípteros amostrados é consistente com estudos similares, que apontaram que os dípteros podem veicular

espécies deste do grupo dos estafilococos (BOUAMAMAA et al., 2010) relacionados a casuística de mastite contagiosa bovina (DUFOUR et al., 2012).

De modo similar aos agentes de origem ambiental na casuística de mastite, o uso do meio seletivo cromogênico Onfarm SmartColor 2™ também possibilitou a identificação de micro-organismos nos dípteros capturados relacionados a casuística a mastite contagiosa bovina, apesar da ausência de detecção de *S. aureus*. Com efeito, refere-se pela primeira vez o uso do meio seletivo cromogênico Onfarm SmartColor 2™ no diagnóstico de bactérias relacionadas a mastite bovina, na superfície corpórea de dípteros capturados no ambiente de ordenha de vacas, em fazendas com histórico de mastite.

Entre 2017 e 2018, o mesmo grupo de pesquisadores do presente estudo investigou a etiologia da mastite clínica em vacas nas mesmas fazendas amostradas do presente estudo. Dentre 2.613 amostras de leite cultivadas, foi obtido o isolamento de 940 isolados, com identificação - por métodos fenotípicos - principalmente de *Streptococcus dysgalactiae* (18,4%), estafilococos coagulase negativo (16,8%), *Escherichia coli* (10,2%), *Klebsiella pneumoniae* (7,5%), *Prototeca* spp. (7,5%), *Streptococcus uberis* (4,5%), *Bacillus* spp. (5,2%), leveduras (4,0%), *Enterococcus* spp. (2,6%), *Pseudomonas* spp. (2,7%), *Enterobacter* spp. (2,0%) e fungos (1,3%) (GUIMARÃES et al., 2019). Curiosamente, exceto *Streptococcus dysgalactiae*, *Prototeca* spp. e *S. uberis*, os demais micro-organismos supracitados, mais frequentemente isolados das vacas com mastite clínica nas fazendas, também foram identificados na superfície corpórea dos dípteros capturados nos mesmos ambientes de ordenha. Tal resultado indica a similaridade dos micro-organismos identificados nas vacas com mastite e de dípteros presentes no ambiente de ordenha e entorno, reforçando a preocupação destes insetos como potenciais veiculadores de agentes de mastite para as vacas.

No grupo diverso de micro-organismos agrupados como miscelânea no presente estudo, espécies de *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Arthorobacter*, *Lysinibacillus* e *Pantoea*, além de *Candida rugosa* e *Trichosporon asahii* já foram descritos como agentes de mastite em vacas (STORMS et al., 2003; SCACCABAROZZI et al., 2011; MBUK et al., 2016; AKADOUCHE et al., 2018; SONG et al., 2020; KUSUMAWATI et al., 2021). Devido à ocorrência ocasional na casuística de mastite bovina e falta de consenso no que tange aos mecanismos de

transmissão, estes micro-organismos foram agrupados como miscelânea no presente estudo.

Certas espécies de *Bacillus* são encontradas no ambiente dos animais de produção, particularmente na cama orgânica. *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. oleronius* e *B. cereus* já foram descritos em casos de mastite em fazendas com problemas de higiene de ordenha, incluindo isolados resistentes aos antimicrobianos convencionais (ABERA et al., 2013.; SADASHIV et al., 2014.; SONG et al., 2020). De modo similar, todas as espécies de *Bacillus* supracitas foram detectadas nos dípteros do presente estudo, reforçando a possibilidade de veiculação de patógenos destes insetos para os animais no ambiente de ordenha.

A gênero *Lactococcus* é amplamente utilizado na produção de alimentos e como probiótico para animais e humanos. Porém, com o avanço das técnicas moleculares, tem sido isolado em casos de mastite clínica em vacas, considerado patógeno ambiental emergente de mastite bovina, particularmente as espécies *Lactococcus lactis* e *Lactococcus garvieae* (RODRIGUES et al., 2016). Coincidentemente, ambas espécies foram isoladas dos dípteros no presente estudo. A baixa frequência de isolamento de espécies de *Lactococcus* nos estudos com dípteros de ambientes de ordenha, bem como em casos de mastite bovina, pode ser atribuída a semelhança bioquímica com espécies de *Enterococcus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *S. uberis* (BRAGA et al., 2018), cuja diferenciação é mais fidedigna utilizando métodos moleculares, como a espectrometria de massas. Neste contexto, a identificação de 97 isolados suspeitos de *Enterococcus* sp. obtidos de mastites nas mesmas fazendas das quais foram capturados os dípteros do presente estudo, resultou na detecção de *Lactococcus lactis* 10,3% e *Lactococcus garvieae* em 5,1% dos isolados (GUIMARÃES et al. 2020).

Leveduras da espécie *Candida rugosa* e o fungo *Trichosporon asahii* são micro-organismos que possuem como habitat o meio ambiente, relacionados a infecções em humanos e animais. Os casos de mastite por fungos e leveduras em vacas comumente estão associados com excesso de umidade e matéria orgânica no ambiente, ou uso não racional de antimicrobianos no tratamento intramamário (RIBEIRO et al., 2016). No presente estudo, ambas espécies foram identificadas nos dípteros e, apesar da baixa frequência, sinalizam que as condições do ambiente da ordenha das fazendas amostradas podem ser favoráveis a

multiplicação destes patógenos, possibilitando a veiculação para animais por dípteros (SCACCABAROZZI et al., 2011 AKDOUCHE et al., 2018).

*Bacillus cereus*, *Comamonas kerstersii*, *Ochorobactrum intermedium*, *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*, *Lodderomyces elongisporus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e espécies de *Acinetobacter* e *Pantoea* detectados em menor frequência no presente estudo - em dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas - têm sido descritos principalmente em infecções oportunistas em humanos e animais, notadamente de origem nosocomial, incluindo diarreia, septicemia, bacteremia, pneumonia, dermatites, osteomielite e infecções do trato urinário (JUNQUEIRA et al., 2017; ALMUZARA et al., 2017; KLOTZ et al., 2019; RYAN et al., 2020; HLADÍCK et al., 2021).

*Bacillus cereus* são bactérias, térmofílicas, formadoras de esporos que apresentam alta adesão às superfícies e elevada resistência térmica, relacionadas a intoxicação de humanos. São encontradas em leite cru e processado, constituindo grande desafio para a indústria de laticínios e derivados, posto que reduzem o tempo de prateleira dos produtos através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas (PORCELLATO et al., 2021). A intoxicação por *B. cereus* secundária ao consumo de alimentos contaminados, possui duas formas patológicas: síndromes diarreica que causa diarreia e cólica e a síndrome emética que causa principalmente náuseas (OLIVEIRA et al., 2017). No presente estudo, a identificação de *B. cereus* em dípteros capturados no ambiente de ordenha concorda com estudo similar (CARDOZO et al., 2009), e reforça que a presença do patógeno nestes insetos apresenta reflexos no contexto de Saúde Pública, quanto a qualidade dos produtos lácteos oferecidos ao consumidor (SONG et al., 2020).

Infecções adquiridas em hospitais humanos por espécies de *Acinetobacter* têm merecido atenção especial da Organização Mundial da Saúde, em virtude da patogenicidade e multirresistência aos antimicrobianos convencionais (MORRIS et al., 2019). No mesmo contexto, *Stenotrophomonas maltophilia* são bactérias oportunistas emergentes relacionadas a infecções nosocomiais em humanos, causando principalmente sepse, pneumonia e enterite crônica grave. Alternativamente, o patógeno já foi descrito em casos de mastite clínica e subclínica em vacas, bem como isolado de queijos e leite cru e pasteurizado (OKUNO et al., 2018). Ainda, *Lodderomyces elongisporus* são leveduras amplamente distribuídas

no meio ambiente, também associadas com infecções graves em humanos adquiridas no ambiente hospitalar, como endocardites (AL-OBAID et al., 2018). De modo similar ao presente estudo, a captura de dípteros em ambiente de UTI neonatal de hospital no Brasil, resultou na identificação de espécies dos gêneros *Bacillus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* não-aureus (CAPEL et al., 2013), reforçando os riscos de veiculação de patógenos por estes insetos para humanos, incluindo em ambientes hospitalares. Neste contexto, *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* têm sido identificadas em sepse e infecções da pele e tecidos moles de humanos, usualmente relacionadas à presença de larvas de moscas em ferimentos ou miíases (HLADÍK et al., 2021).

*Ochrobactrum* spp. são bactérias encontradas na água, solo e plantas. Em humanos estão relacionadas a infecções oportunistas graves de difícil tratamento, como endocardite e septicemia em pacientes hospitalizados (RYAN e PEMBROKE., 2020). De modo similar, *Comamonas kerstersii* também são bactérias encontradas na água, solo e plantas, identificadas em infecções multirresistentes aos antimicrobianos em humanos causando apendicite, abscessos e infecções do trato urinário (ALMUZARA et al., 2017).

*Pantoea* spp. são enterobactérias isoladas de plantas, solo e certos alimentos. *P. agglomerans* é a espécie mais comumente isolada de humanos, resultando em infecções de articulações, tecidos moles ou ossos, secundárias a traumas por objetos perfurocortantes (CRUZ et al., 2007).

*Kurthia gibsonii*, *Pluribacter pyrinus* e *Alcaligenes faecalis* foram identificados em baixa frequência nos dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas. São bactérias encontradas no ambiente, embora não tenham sido descritas - na literatura consultada - como patógenos primários para animais, enquanto *Weissella* spp. têm sido testada como probiótico para a cura de mastites crônicas por *S. aureus* (Cock et al., 2019).

No tocante às diferenças entre as fazendas amostradas, na fazenda A predominou o isolamento *S. sciuris*, agente relacionado a mastite bovina de origem contagiosa, enquanto nas demais fazendas predominaram micro-organismos ambientais, como *E. coli* nas fazendas C, E e H, e espécies de *Enterococcus* nas fazendas B, D, F, I e J. Todas as fazendas revelaram maior captura de dípteros da família Muscidae, exceto a fazenda B com predomínio de Tachinidae (JUNQUEIRA

et al., 2017). Apesar destas tendências, o restrito número de espécimes de insetos capturados de cada família de díptero em cada fazenda, não possibilitaram comparação estatística, podendo ser considerados uma limitação do presente estudo.

Posto o potencial observado dos dípteros de veicular micro-organismos relacionados a ocorrência de mastite ambiental ou contagiosa em vacas nas fazendas amostradas, bem como a relevância de certos patógenos identificados em saúde humana, faz-se necessário a adoção sistemática de medidas de controle e profilaxia nas fazendas visando evitar a proliferação destes insetos; incluindo a retirada diária de dejetos do ambiente de ordenha e entorno, evitar acúmulo de barro e umidade no ambiente de ordenha, uso de armadilhas químicas e físicas para o controle de dípteros, drenagem de regiões alagadiças, além da retirada de lixo e entulho próximo ao ambiente de ordenha dos animais (SARWAR et al., 2015).

A impossibilidade de caracterização de todas as espécies dos dípteros, bem como a ausência de colheita simultânea dos espécimes de insetos e das vacas com mastite clínica no mesmo ambiente de ordenha- visando comparar os micro-organismos identificados- podem ser consideradas limitações do presente estudo.

## 7. Conclusão

Dípteros da família Muscidae foram mais frequentes entre os insetos capturados, indicando maior preocupação com as ações de controle/profilaxia que visem evitar a manutenção e proliferação destes insetos no ambiente da ordenha e entorno;

✓ Grande complexidade de micro-organismos foi identificada na superfície corpórea dos dípteros capturados no ambiente de ordenha, com maior frequência de espécies de *Enterococcus* e *Escherichia coli*, indicando alto potencial de veiculação de enterobactérias para as vacas nas fazendas amostradas, relacionadas a mastite bovina de origem ambiental;

✓ *Staphylococcus sciuri* foi o micro-organismo mais frequente detectado nos dípteros relacionado à mastite bovina de origem contagiosa, indicando também a possibilidade de veiculação deste grupo de patógenos para as vacas no ambiente de ordenha;

✓ *Bacillus cereus*, *Comamonas kerstersii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum intermedium*, *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*, *Lodderomyces elongisporus*, e espécies de *Acinetobacter* e *Pantoea* foram identificados nos dípteros capturados no ambiente de ordenha, sinalizando o risco destes insetos na veiculação de patógenos relacionados a infecções oportunistas e intoxicações em humanos;

## 8. REFERÊNCIAS\*

ABERA, B.; LEMMA, D.; ITICHA, Y. Study of bovine mastites in asella government dairy farm of Oromia Regional state. South Eastern Ethiopia, V1, p134-145, 2013.

AKDOUCHE, L.; AISSI, M.; SAADI, A.J. Prevalence and Identification of Yeasts Responsible for Mastitis in Dairy Cattle Farms in the Sidi Lahcene Region in the Wilaya of Sidi Bel abbes Algeria. *Adv Dairy Res*, v6, p2, 2018.

AKHTAR, M.; HIRT, H.; ZUREK, L. Horizontal Transfer of the Tetracycline Resistance Gene tetM Mediated by pCF10 Among *Enterococcus faecalis* in the House Fly (*Musca domestica* L.) Alimentary Canal. *Microb Ecol* V58, P509–518, 2009.

ALEGBELEYE, O.O.; SINGLETON, I.; SANT'ANA, A.S; Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, v.73, p177-203, 2018.

ALMUZARA, M.; BARBERIS, C.; VEIGA, F.; BAKAI, R.; CITTADINI, R.; VERA, R.; OCAMPO, C.; SERENA, M.; COHEN, A.; RAMIREZ, M.S.; FAMIGLIETTI, A.; STECHER, D.; CASTILLO, M.; VAY, C. New Unusual presentations of *Comamonas kerstersii* infection. *Microbe and New Infect*, v19, p91–95, 2017.

ALMEIDA, L. M.; & MISE, K. M. Diagnosis and key of the main families and species of South American Coleoptera of forensic importance. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.53, 227-244, 2009.

ALMEIDA, J.L.; GIUFFRIDA, R.; ANDRADE, R.A.P.; CHAVES, M.P. Muscoid Diptera as potential vectors of bacterial agents on dairy farms in the northern region of Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias.*, v. 35, n. 6, p. 3127-3138, 2014.

ALVES, T.S.; LARA, G.H.B.; MALUNA, R.P.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, D.S. Carrier flies of multidrug-resistance *Escherichia coli* as potential dissemination agents in dairy farm environment. *Science of the total environment*, v. 633, p. 1354-1351, 2018.

\*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22 p,

ALMUZARA, M.; BARBERIS, C.; VEIGA, F.; BAKAI, R.; CITTADINI, R.; CAMPO, V.C.; ALONSO, M. Unusual presentations of *Comamonas kerstersii* infection. *New Microbes and New Infections*, V19, N10, 2017.

AL-OBAID, K.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; KHAN, Z. *Lodderomyces elongisporus*: a bloodstream pathogen of greater clinical significance. *New Microbes and New Infections*, v26, p20-24, 2018.

ARMORIM, D.S.; SILVA, V.C.; BAIBI, M.I.P.A. Estado do conhecimento dos Diptera neotropicais, p. 29-36. In: C. COSTA, S.A. VANIN, J.M. LOBO, A. MELIC (EDS). Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática PriBES. M3m Monografias Tercer Milênio, vol. 2. *Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA) & Cytel*, Zaragoza, 329 p, 2002.

ARSENOPOULOS, K.V.; TRIANTAFILLOU, E.; FILIOUSSIS, G.; PAPADOPOULOS, E. Fly repellency using deltamethrin may reduce intramammary infections of dairy cows under intensive management. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. v.61, p16-23, 2018.

ARSENOPOULOS, K.V.; SIOUTAS, G.; TRIANTAFILLOU, E.; GELASAKIS, A.I.; PAPADOPOULOS, E. Will fly repellency using deltamethrin reduce intramammary infections, stress and fatigue indicators of dairy ewes under intensive management. *pathogens*, v10, p232, 2021.

BioSystematic Database of World Diptera- BDWD, 2021. Atualizado agosto 2021 <http://www.diptera.org> acesso em 18/10/2021.

BITTENCOURT, A.J. Avaliação de surtos e medidas de controle ambiental de *Stomoxys calcitrans* (diptera: muscidae) na região sudeste do brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v34, p73-82, 2012.

BOUAMAMAA, L.; SORLOZANO, A.; LAGLAOUI, A.; LEBBADI, M.; AARAB, A.; GUTIERREZ, J. Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from *Periplaneta americana* and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 4, n. 4, p. 194-201, 2010.

BRAGA, P.A.C.; GONÇALVES, J.L.; BARREIRO, J.R.; FERREIRA, C.R.; TOMAZI, T.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Pesq. Vet. Bras.* V38(4), P 586-594, 2018.

BRAVERMAN, Y., CHIZOV-GINZBURG, A., SARAN, A., WINKLER, M. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. *Revue Scientifique et Technique*, v.18, p.681–690, 1999.

BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; BARBIERI, F.S.; NETTO, F.G.S.; CHAGAS, A.C.S. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório. Porto Velho: Embrapa Rondônia; 2008.

CAPEL, H.B.; OLIVEIRA, A.G.; SILVA, P.R.; PELLI, A. Insetos voadores que não picam como portadores de doenças patogênicas bacterianas em um hospital brasileiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(2):234-236, Mar-Abr, 2013.

CARVALHO, C.J.B.; MELLO-PATIU, C.A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, V 52(3), p 390-406, 2008.

CARVALHO, C.J.B.; RIBEIRO, P.B. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*, v. 9(2), p169-173, 2000.

CARVALHO, C.J.B.; MOURA, M.O.; RIBEIRO, P.B. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v46, p107-144, 2002.

CARVALHO, C.J.B.; RAFAEL, J.A.; COURI, M.S.; SILVA, V.C. Dípteros. In: Rafael, J.A. Insetos do Brasil- Diversidade e Taxonomia. 1ed, Ribeirão Preto: Holos, 2012, p810.

CARDOZO, G. M. B. Q.; MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F.; TRENTO, F. K. H. S. *Musca domestica* como vetor de microrganismos patogênicos para queijo Minas Frescal Ultrafiltrado. *Brazilian Journal of Food Technology*, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 85-91, 2009.

CASTRO, B.G.; SOUZA, M.M.S.; BITTENCOURT, A.J. Isolamento de espécies enterobacterianas em *Stomoxys calcitrans*. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1, 2008.

CASTRO, B. G.; SOUZA, M. M. S.; RÉGUA-MANGIA, A. H.; BITTENCOURT, A. J. Enterobacterial Microbiota on *Stomoxys calcitrans* External Surface. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 57, p. 22-24, 2010.

CASTRO, B. G.; SOUZA, M. M. S.; REGUA, A. H.; REGUA M, A.H.; BITTENCOURT, A. J. Occurrence of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 318, 2013.

CASTRO, B. G.; SOUZA, M. M. S.; REGUA M, A.H.; BITTENCOURT, A. J. Genetic relationship between *Escherichia coli* strains isolated from dairy mastitis and from the stable fly *Stomoxys calcitrans*. *Pesquisa veterinaria brasileira*, v. 36, p. 479-484, 2016.

CHENG, J.; ZHOU, M.; NOBREGA, D.B.; Barkema, H.W.; Xu, S.; Li, M.; Kastelic, J.P.; Shi, Y.; Han, B.; Gao, J: Genetic diversity and molecular epidemiology of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* mastitis on two large Chinese dairy farms. *J. Dairy Sci.* V. 104, p762–775, 2020.

CHIRICO, J.; JONSSON, P.; KJELLBERG, S.; THINTHOMAS, G.; Summer mastitis experimentally induced by *Hydrotaea irritans* exposed to bacteria. *Medical and Veterinary Entomology* V 11, P187-192, 1997.

COBIRKA M.; TANCIN V.; SLAMA P.\* Review Epidemiology and Classification of Mastitis Animals, *Animals* v.10, P2212, 2020;

Cock. L.S.; & Rodríguez, O.V.P.; Gómez, G.I.G. Adhesion Capacity of *Weissella cibaria* to Bovine Mammary Tissue and the Effect of Bio-Sealant Topical Application on Physicochemical Properties of Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, V11:1293–1299, 2019.

COURI, M.S. Myiasis caused by obligatory parasites. Ia. *Philornis*, *Meinert* (Muscidae), p. 5 1-70. In: J.H. Guimarães & N. Papàvero (eds.). *Myiasis in man and animais in the Neotropical Region*. São Paulo, Plêiade/ FAPESP, 308 p, 1999.

CRUZ, A.T.; CAZACU, A.C.; ALLEN, C.H. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, V1, p. 1989–1992, 2007.

DEAN AG, SULLIVAN KM, SOE MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão. <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>, atualizado 2013/04/06, acessado 2019/02/25.

DUFOUR, S.; DOHOO, I. R.; BARKEMA, H. W.; DESCÔTEAUX, L.; DEVRIES, T. J.; REYHER, K. K.; ROY, J. P.; SCHOLL, D. T. Epidemiology of coagulase negative *staphylococci* intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological

culture misclassification. *Journal of dairy science*, Champaign, v. 95, n. 6, p. 3110-3124, 2012.

ESPINOZA, J.; FUENTES, M.C.; QUIROZ, A.; BARDEHLE, L.; BAHAMONDES, P.E.; UNGERFEL, E. Antifeedant Effects and Repellent Activity of Loline Alkaloids from Endophyte-Infected Tall Fescue against Horn Flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Molecules*, V26, p817, 2021.

FÖRSTER, M.; SIEVERT, K.; MESSLER, S.; KLIMPEL, S.; PFEFFER, K. Comprehensive study on the occurrence and distribution of pathogenic microorganisms carried by synanthropic flies caught at different rural locations in Germany. *Journal of Medical Entomology*, v. 46, n. 5, p. 1164-1666, 2009.

FORTES, E. *Parasitologia veterinária*. 4. ed. São Paulo; Editora Ícone, 2004 p 443-497.

GAO, X.; FAN, C.; ZHANG, Z.; LI, S.; XU, C.; ZHAO, Y.; HAN, L.; ZHANG, D.; LIU, M. Enterococcal isolates from bovine subclinical and clinical mastitis: Antimicrobial resistance and integron-gene cassette distribution. *Microbial Pathogenesis* V129, P82–87, 2019

GHALEHNOO, M.R. Housefly (*Musca domestica* ) as Carrier of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Broiler Farms in Iran: Is it Important for Public Health. *Int J Enteric Pathog*. V3, P25688, 2015.

GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.C.; FERREIRA, C.R.; JUNIOR, J.P.A.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M,V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology* v173, p147–151, 2014.

GONÇALVEZ, J.L.; KAMPHUIS, C.; MARTINS, C.M.M.R.; BARREIRO, J.R.; TOMAZI, T.; GAMEIRO, A.H.; HOGEVEEN, H.; SANTOS, M.V. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Science*, v.210, P25–32, 2018.

GRANJA, B.M.; FIDELIS, C.E.; GARCIA, B.L.N.; SANTOS, M.V. Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastites. *Journal of Dairy Science*, V103, P9115-9129, 2021.

GUIMARAES, F. F.; JOAQUIM, SÂMEA FERNANDES ; GUERRA, S. T. ; DALANEZI, F. M. ; LOPES, B. C. ; PANTOJA, J. C. F. ; RIBEIRO, M. G. ;

HERNANDES, R. T. ; RALL, V. L. M. ; LANGONI, H. . Etiology of clinical mastitis in high-yield farms Southeastern, Brazil. In: National Mastitis Council 58th Annual Meeting, 2019, Savannah. Annual Meeting Proceedings (2019). 2019. v. 1. p. 186-187.

GUIMARÃES. F.F.; MORAES, G.N.; JOAQUIM, S.F.; GUERRA, S.T.; DALANEZI, F.M.; LOPES, B.C.; PANTOJA, J.C.F.; RIBEIRO, M.G.; HERNANDES, R.T.; RALL, V.L.M.; SANTOS, M.V.; LANGONI, H. Identification of *Enterococcus* spp. Isolated from Milk Samples of Clinical Mastitis. In: National Mastitis Council- NMC, nº59, 2020, Orlando- Florida. Botucatu: anais, 28-31-2020. P195-196.

GUÉGAN, M.; ZAUACHE, K.; DÉMICHEL, C.; MINARD, G.; VAN, V.T.; POTIER, P.; MAVINGU, P.; MORO, C.V. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* V6, P49, 2018.]

GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, A.J.; MARTÍNEZ-ORTEGA, E.A.; VALENCIA-POSADAS, M.; LEÓN-GALVÁN, M.F.; FUENTE-SALCIDO, N.M.; BIDESHI, D.K.; BARBOZA-CORONA, J.E. Potential use of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins to control antibiotic-resistant bacteria associated with mastitis in dairy goats. *Folia Microbiol*, V61, P11–19, 2016.

HLADÍK, M.; LIPOVY, B.; KALOUDOVA, Y.; HANSLIANOVA, M.; VITKOVA, I. Human Infections by *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*: A Mini-Review and the First Report of a Burn Wound Infection after Accidental Myiasis in Central. Europe *Microorganisms*, V9, P1934, 2021.

IOANNOU, P. *Escherichia hermannii* Infections in Humans: A Systematic Review. *Trop. Med. Infect. Dis*, V4, P17, 2019.

JACQUES, B. J., BOURRET, 1 T. J., SHAFFER, J. J. Role of Fly Cleaning Behavior on Carriage of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Entomology*, v54(6), p1712–1717, 2017.

JAHAN, N.A.; GODDEN, S.M.; ROYSTER, S.; SCHOENFUSS, T.C.; GEBHART, C.; TIMMERMAN, J.; FINK, R.C. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system in the detection of mastitis pathogens from bovine milk samples. *Journal of Microbiological Methods* V182, P106168, 2021.

JAMALI, H.; BARKEMA, H.W.; JACQUES, M.; LEVALLÉE-BOURGET, E.; MALOUIN, F.; SAINI, V.; STRYHN, H.; DUFOUR, S. INVITED REVIEW: Incidence, risk factors, and effects on clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J. Dairy Sci.* v 101, p4729–4746, 2018.

JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. v451, p 990-993, 2008.

JUNQUEIRA, A.C.; RATAN, A.; ACERBI, E.; DRAUTZ-MOSES, A.I.; BALAKRISHNAN, N. V.; PREMKRISHNAN, P.I.; BODO, L.; RIKKY W.; PAULO, D.F.; GAULTIER, N.E.; SUBRAMANIAN, P.; HASAN, N.A.; COLWELL, R.R.; BORK, P.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; BRYANT, D.A.; STEPHAN C.S. The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. *Scientific Reports*, v7, p16324, 2017.

KAMENEVA, E.P. A new species of genus *Plagiocephalus* (Diptera, Ulidiidae) from Central America. *Vestnik zoologii* v38(4): 15-22, 2004.

KLAAS, I.C.; ZADOKS, R.N. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transb Emerg Dis*. v65 (suppl. 1):166-185, 2018.

KLOTZ, P.; HIGGIN, P.G.; SCHAUBMAR, A.R .; FAILING, K .; LEIDNER, U.; SEIFERT, H.; SCHEUFEN, S.; SEMMLER, T.; EWERS, C. Seasonal Occurrence and Carbapenem Susceptibility of Bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany. *Frontiers in microbiology*. V10, p272 2019.

KUSUMAWATI, A.; MUSTOPA, A.Z.; WIBAWAN, I.W.T.; A SETIYONO, A.; SUDARWANTO, M.B. Metagenomic analysis of pathogen mastitis in cow's milk from Cicurug, Sukabumi, West Java, Indonesia. *Earth and Environmental Science* V762, P12064, 2021

LEVINE, O. S.; LEVINE, M. M. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. *Reviews of Infectious Diseases*, Chicago, v13, n. 4, p. 688-696, 1991.

MARINONI, L.; MORALES, M.N.; SPALER L. Chave para identificação ilustrada para os gêneros de Syrphinae (Diptera, Syrphidae) de ocorrência no sul do Brasil. *Biota Neotropica* v7(1), p1 45-160, 2007.

MBUK, E.U.; KWAGA, J.K.P.; BALE, J.O.O.; BORO, L.A.; UMOH, J.U. Coliform organisms associated with milk of cows with mastitis and their sensitivity to commonly available antibiotics in Kaduna State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, V 8(12), pp. 228-236, 2016

MENDES, M. F.; GOTTSCHALK, M.S.; CORRÊA, R.C.; Valente-Gaiesky, V. L. S. Functional traits for ecological studies: a review of characteristics of Drosophilidae (Diptera). *Community Ecology*, v22, 2021.

MIAN, L.S.; MAAG, H.; TACAL, J.V. Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California. *J Vector Ecol*, v27(1), p82–85, 2002.

MOHAMMED, A.N; ABDEL-LATEF, G.K; ABDEL-AZZEM, N.M; EL-DAKHLY, K.M. Ecological study on antimicrobial-resistant zoonotic bacteria transmitted by flies in cattle farms. *Parasitol Res*. v10, n115, p. 3889-96, 2016.

MORIYA, K.; FUJIBAYASHI, T.; YOSHIHARA, T.; MATSUDA, A.; SUMI, N.; UMEZAKI, N. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 carried by the housefly in Japan. *Med. Vet. Entomol*, v13, p214-216, 1999.

MORRIS, F.C.; DEXTER, C.; KOSTOULIAS, X.; IKHTEAR M.; PELEG, A.Y. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii* *Frontiers in microbiology* v10, p1601, 2019.

MUNOZ, M.A.; WELCOME, F.L.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J Clin Microbiol*. v45:3964-3971, 2007.

NARTSHUK, E.P.; Polevoi, A.V.; Przhiboro, A.A. A review of grassflies (Diptera, Chloropidae) of Karelia and Murmansk Province of Russia. *Fauna Norvegica* v40, p 47–92, 2020.

NAZNI, W.A.; LUKE, H.; WAN ROZITA, W.M.; ABDULLAH, A.G.; SA'DIYAH.; AZAHARI, A.H.; ZAMREE, I.; TAN, S.B.; LEE, H.L.; SOFIAN, M.A. Determination of the flight range and dispersal of the house fly, *Musca domestica* (L.) using mark release recapture technique. *Tropical Biomedicine* v. 22, p. 53–61, 2005.

NIHEI, S.S.; LOPES, A.C.; DIOS, R.V.P.; GUDIN, F.M. Check-list of the *Tachinidae* (Diptera) of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, v107(supl.): p 201, 2017.

OKUNO, N.T.; FREIRE, I.R.; SEGUNDO, R.T.R.S.; SILVA, C.R.; MARIN, V.A. Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cheese Samples Based on the smeT Gene. *Current Microbiology*, V75, P1555–1559, 2018;

OLIVEIRA, E.B.; TOMAIM, M.R.; SILVA, S.P.; TOLEDO, R.C.C. CARACTERIZAÇÃO DA INTOXICAÇÃO ALIMENTAR CAUSADA PELO *Bacillus cereus*: UMA REVISÃO. *Higiene Alimentar*, Vol.31, P268/269, 2017.

PAPAVERO, N.; T. PIMENTEL, T.J. Insecta- Diptera- Piophilidae (incl. Thyreophoridae). *Fauna da Amazônia brasileira* v15: p1-3, 2002.

PÉREZ, S.; CARVALHO, C.J.B; Family *Muscidae*. *Zootaxa*, v4122 (1), p814–853, 2016.

PORCELLATO, D.; SKEIE, S.B.; MELLEGÅRD, H.; MONSHAUGEN, M.; GORANSSON, S.A; AANRUD, B.; LINDSTEDT, M.A; ASPHOLM, M. Characterization of *Bacillus cereus* sensu lato isolates from milk for consumption; phylogenetic identity, potential for spoilage and disease. *Food Microbiology*, V93, P103604, 2021.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD , F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 912p, 2011.

RAFAEL, J.A.; T. DE J. PIMENTEL; F.S.P. GODOI & R.J.P. MACHADO. The enigmatic genus *Ctenostylum* Macquart with the description of a new species from the Brazilian Amazon Basin and a checklist of world *Ctenostylidae* species (Diptera). *Zootaxa* v20: p63-68, 2009.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, A.S.; CONSTANTINO, R. Chave para Ordens - Adultos. In: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. (Eds.); *Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia*. 2012, Editora Holos. pp.191-197 e p701-745.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, A.S.; CONSTANTINO, R (2012). Diptera. IN: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. (Eds.); *Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia*, 2012 Editora Holos. p.701-745.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, A.S.; CONSTANTINO, R. (2012). Coleoptera. In: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. (Eds.); *Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia*. 2012 Editora Holos. pp.453-537.

RAHUMA, N.; GHENGHESH, K. S.; BEN AISSA, R.; ELAMAARI, A. Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 99, n. 8, p. 795-802, 2005.

RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; PANTOJA, J.C.F. Mastite em animais domésticos. *In: Megid, J.; Ribeiro M. G.; Paes A. C. Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. 1ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016, v. 1, p. 1154-1205.*

RIBEIRO, M.C.; MORAIS, A.B.C.; ALVES, A.C.; BOLAÑOS, C.A.D.; PAULA, C.L.; PORTILHO, F.V.R.; JÚNIOR, G.V.; LARA, G.H.B.; MARTINS, L.S.A.; MORAES, L.S.; RISSETI, R.M.; GUERRA, S.T.; BELLO, T.S.; SIQUEIRA, A.K.; BERTOLINI, A.B.; RODRIGUES, C.A.; PASCHOAL, N.R.; ALMEIDA, B.O.; LISTONI, F.J.O.; SÁNCHEZ, L.F.G.; PAES, A.C. *Klebsiella*-induced infections in domestic species: a case-series study in 697 animals (1997-2019). *Braz J Microbiol*, V53(1), P455-464, 2022.

RODRIGUES, M.X.; LIMA, S.F.; HIGGINS, C.H.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; BICALHO, J. The *Lactococcus* genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation. *Dairy Sci.* 99:9864–9874, 2016.

RUEGG, P. Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* v 100, p 10381–10397, 2017.

RUTZ, D.A.; GEDEN, C.J. PEST management recommendations for dairy cattle. [Monografia na internet]. A Cornell and Penn State Cooperative Extension Publication; 2010

RYAN, M.P.; PEMBROKE, J.T. The Genus *Ochrobactrum* as Major Opportunistic Pathogens *Microorganisms*, V8, P1797, 2020.

SADASHIV, S.O.; KALIWAL, B.B. Isolation, characterization and antibiotic resistance of *Bacillus* sp. from bovine mastitis in the region of north Karnataka, India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, V3(4), P360-373, 2014.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L; Controle da Mastite e Qualidade do Leite; Pirassununga- SP, Edição dos Autores, p62, 2019.

SARWAR, M. Insect Vectors Involving in Mechanical Transmission of Human Pathogens for Serious Diseases International. *Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering* v1, No. 3, p. 300-306, 2015.

SCACCABAROZZI, C.; LOCATELLI, G.; PISONI, G.; MANAROLLA, A.; CASULA, V.; MORONI, P. Short communication: Epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. *Dairy Sci.* V94, P4574–4577, 2011.

SCHAUMBURG, F.; ONWUGAMBA, F.C.; AKULENKO, R.; PETERS, G.; MELLMANN, A.; KÖCK, R.; BECKER, K. A geospatial analysis of flies and the spread of antimicrobial resistant bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* v5, p306-56, 2016.

SCHUSTER, G. L.; DONALDSON, J. R.; BUNTYN, J. O.; DUOSS, H. A.; CALLAWAY, T. R.; CARROLL, J. A.; FALKENBERG, S.M.; SCHMIDT, T. B. Use of bioluminescent *Escherichia coli* to determine retention during the life cycle of the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae, L). *Foodborne pathogens and disease*, Larchmont, v. 10, n. 5, p. 442-447, 2013

SCHUKKEN Y., CHUFF M, MORONI P, GURJAR A, SANTISTEBAN C, Belomestnykh N, Zadocks RN. 2011. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J Dairy Sci.* v 94, p6203-6215, 2012.

SONG, X.; HUANGC, X.; XUC, H.; ZHANG, C.; CHENA, S.; LIUA, F.; GUANA, S.; ZHANGA, S.; ZHUA, K.; WUA, C. The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. *Veterinary Microbiology*, V247, P108757, 2020.

SOUZA, T.F.; CANÇADO, P.H.D.; BARROS, A.T.M. Attractivity of vinasse spraying to stable flies, *Stomoxys calcitrans* in a sugarcane área. *Pesq. Vet. Bras.* 41:e06817, 2021.

STIREMAN, J.O.; O'HARA, J.E.; Wood, D.M. *Tachinidae*: Evolution, behavior, and Ecology. *Annual Review of Entomology* v51, p 525-555, 2006.

STORMS, V.; DEVRIESE, L.A.; COOPMAN, R.; SCHUMANN, P.; VYNCKE, F.; GILLIS, M. *Arthrobacter gandavensis* sp. nov., for strains of veterinary origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1881–188, 2003.

TEPEDINO, K.P.; PRESTES, A.C.; KOSMANN, C.; FRANCO, A.C.; PUJOL-LUZ, J.R.; PUJOL-LUZ, C.V.A. Lista das espécies de *Ropalomeridae*, *Sphaeroceridae* e *Ulidiidae* (Diptera, Acalyptratae) do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, v107(supl.): p 2017147, 2017.

VIRPARI, P.K.; NAYAK, J.B.; THAKER, H.C.; BRAHMBHATT, M.N. Isolation of pathogenic *Escherichia coli* from stool samples of diarrhoeal patients with history of raw milk consumption *Veterinary World*, EISSN: p 2231-0916, 2013.

ZADOKS, R.N. Strain-specific pathogenicity of putative host-adapted and nonadapted strains of *Streptococcus uberis* in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, v96, p5129–5145, 2013.

ZOUHAROVA, M.; RYSANEK, D. Multiplex PCR and RPLA Identification of *Staphylococcus aureus*. Enterotoxigenic Strains from Bulk Tank Milk. *Zoonoses Public Health*, v55, p 313–319, 2008

YOON, S., LEE, Y.J. Molecular characteristics of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Bulk tank milk in Korea. *Animals*, 11(3), 661, 2021.

**ANEXO 1: Prevalência, por fazenda, de micro-organismos identificados em dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas, diagnosticados por espectrometria de massas\*.**

Fazenda	Família	N/ Total dípteros por fazenda/ %	Micro-organismos	N/ Total isolados por fazenda/%
A	Muscidae	13/24 (54,2%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	13/49 (26,5%)
	Drosophilidae	8/24 (33,4%)	<i>Enterococcus</i> spp.	9/49 (18,4%)
	Tachinidae	2/24 (8,3%)	<i>Bacillus cereus</i>	4/49 (8,2%)
	Sphaeroceridae	1/24 (4,2%)	<i>Weissella</i> spp.	4/49 (8,1%)
			<i>Bacillus megaterium</i>	3/49 (6,1%)
			<i>Escherichia coli</i>	2/49 (4,1%)
			<i>Lactococcus</i> spp.	2/49 (4,1%)
			<i>Lodderomyces</i> spp.	2/49 (4,1%)
			<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2/49 (4,1%)
			<i>Arthrobacter gandavensis</i>	1/49 (2,0%)
			<i>Bacillus licheniformis</i>	1/49 (2,0%)
			<i>Escherichia hermannii</i>	1/49 (2,0%)
			<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/49 (2,0%)
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1/49 (2,0%)		
<i>Pluralibacter pyrinus</i>	1/49 (2,0%)			
<i>S. saprophyticus</i>	1/49 (2,0%)			
<i>Staphylococcus simulans</i>	1/49 (2,0%)			
B	Tachinidae	15/24= 62,5%	<i>Enterococcus</i> spp.	5/36 (13,9%)
	Muscidae	6/24= 25%	<i>Escherichia coli</i>	4/36 (11,1%)
	Sepsidae	2/24= 8,3%	<i>Enterobacter cloacae</i>	3/36 (8,3%)
	Sphaeroceridae	1/24= 4,2%	<i>Pantoea</i> spp.	3/36 (8,3%)
			<i>Weissella</i> spp.	3/36 (8,3%)
			<i>Acinetobacter</i> spp.	3/36 (8,3%)
			<i>Pseudomonas Fulva</i>	2/36 (5,6%)
			<i>Bacillus cereus</i>	2/36 (5,6%)
			<i>Stenotrophomonas</i> spp.	2/36 (5,6%)
			<i>Staphylococcus sciuri</i>	2/36 (5,6%)
			<i>Staphylococcus xylosus</i>	1/36 (2,8%)
			* <i>S. saprophyticus</i>	1/36 (2,8%)
			<i>Lactococcus garvieae</i>	1/36 (2,8%)
			<i>Candida rugosa</i>	1/36 (2,8%)
			<i>Trichosporon asahii</i>	1/36 (2,8%)
<i>Bacillus licheniformis</i>	1/36 (2,8%)			
<i>Ochrobactrum</i> spp.	1/36 (2,8%)			

C	Muscidae	19/24= 79%	<i>Escherichia coli</i>	6/26 (23,07%)
	Chloropidae	3/24= 12,5%	<i>Staplycoccus sciuri</i>	4/26 (15,3%)
	Tachinidae	1/24= 4,2%	<i>Pantoea ananatis</i>	4/26 (15,3%)
	Sphaeroceridae	1/24= 4,2%	<i>Pantoea agglomerans</i>	2/26 (7,7%)
			<i>Wohlfahrtiimonas</i> spp.	2/26 (7,7%)
			<i>Enterococcus</i> spp.	2/26 (7,7%)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Escherichia hermannii</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Bacillus oleronius</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Weissella cibaria</i>	1/26 (3,8%)
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	1/26 (3,8%)			
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1/26 (3,8%)			
D	Muscidae	19/24= 79,1%	<i>Enterococcus</i> spp.	5/20 (25%)
	Ulidiidae	3/24= 12,5%	<i>Escherichia coli</i>	4/20 (20%)
	Tachinidae	1/24= 4,2%	<i>Escherichia hermannii</i>	2/20 (10%)
	Não diptero	1/24= 4,2%	<i>Escherichia vulneris</i>	2/20 (10%)
	Apidae		<i>Bacillus cereus</i>	2/20 (10%)
			<i>Lactococcus</i> spp.	2/20 (10%)
			<i>Staphylococcus sciuris</i>	1/20 (5%)
<i>Pantoea agglomerans</i>			1/20 (5%)	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1/20 (5%)			
E	Muscidae	16/24= 66,6%	<i>Escherichia coli</i>	13/33 (39,4%)
	Tachinidae	4/24= 16,7%	<i>Enterococcus</i> spp.	6/33 (18,2%)
	Sepsidae	2/24= 8,3%	<i>Proteus mirabilis</i>	3/33 (9,1%)
	Sphaeroceridae	1/24= 4,2%	<i>Pseudomonas fulva</i>	2/33 (6,1%)
	Chloropidae	1/24= 4,2%	<i>Acinetobacter</i> spp.	2/33 (6,1%)
			<i>Stenotrophomonas</i> spp.	2/33 (6,1%)
			<i>Pseudomonas monteilii</i>	1/33 (3,0%)
			<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/33 (3,0%)
			<i>Ochrobactrum</i> spp.	1/33 (3,0%)
			<i>Comamonas kerstersii</i>	1/33 (3,0%)
<i>Weissella cibaria</i>	1/33 (3,0%)			
F	Muscidae	23/24= 95,8%	<i>Enterococcus</i> spp.	10/26 (40%)
	Não diptero	1/24= 4,2%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5/26 (19%)
			<i>Escherichia coli</i>	4/26 (15,4%)
			<i>Bacillus cereus</i>	3/26 (11%)
			<i>Bacillus licheniformis</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Escherichia fergusonii</i>	1/26 (3,8%)
<i>S. chromogenes</i>	1/26 (3,8%)			
H	Muscidae	21/24= 87,5%	<i>Escherichia coli</i>	12/27 (44,4%)
	Drosophilidae	3/24= 12,5%	<i>Enterococcus</i> spp.	10/27 (37%)

			<i>Enterobacter cloacae</i>	1/27 (3,7%)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/27 (3,7%)
			<i>Proteus mirabilis</i>	1/27 (3,7%)
			<i>Klebsiella variicola</i>	1/27 (3,7%)
I	Muscidae	21/24= 87,5%	<i>Enterococcus</i> spp.	15/31 (48,4%)
	Calliphoridae	1/24= 4,2%	* <i>Entero. xiangfangensis</i>	4/31 (12,9%)
	Syrphidae	1/24= 4,2%	<i>Enterobacter cloacae</i>	3/31 (9,7%)
	Piophilidae	1/24= 4,2%	<i>Escherichia coli</i>	3/31 (9,7%)
			<i>Staphylococcus sciuri</i>	2/31 (6,4%)
			* <i>S. epidermidis</i>	2/31 (6,4%)
			<i>Bacillus cereus</i>	1/31 (3,23%)
			<i>Stenotrophomonas</i> spp.	1/31 (3,23%)
J	Muscidae	14/25= 56%	<i>Enterococcus</i> spp.	8/26 (30,8%)
	Sphaeroceridae	5/25= 20%	<i>Enterobacter cloacae</i>	3/26 (11,5%)
	Syrphidae	3/25= 12%	* <i>Entero. xiangfangensis</i>	2/26 (7,7%)
	Ulidiidae	1/25= 4%	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2/26 (7,7%)
	Calliphoridae	1/25= 4%	<i>Klebsiella variicola</i>	2/26 (7,7%)
	Sarcophagidae	1/25= 4%	<i>Klebsiella cloacae</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Escherichia coli</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Bacillus cereus</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Lactococcus lactis</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Pantoea agglomerans</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Acinetobacter baylyi</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Kurthia gibsonii</i>	1/26 (3,8%)
			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1/26 (3,8%)

\* *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight* = MALDI-TOF; N= Número de dípteros e isolados; %=frequência dos dípteros e isolados.

\**Staphylococcus saprophyticus*.

\**Staphylococcus epidermidis*.

\**Enterobacter xiangfangensis*

**ARTIGO\***

(\*Formatado nas normas da revista Transboundary and Emerging Diseases)

**Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry, in dipterans captured in the milking environment**

\*Amanda Bezerra Bertolini<sup>1</sup>\*, Aline Marrara Prado<sup>2</sup>, Patrícia Jacqueline Thyssen<sup>2</sup>, Mateus de Souza Ribeiro Mioni<sup>1</sup>, Fábio Lucas Rezende de Gouvea<sup>1</sup>, Domingos da Silva Leite<sup>4</sup>, Helio Langoni<sup>1</sup>, Jose Carlos Figueiredo Pantoja<sup>1</sup>, Vera Moraes Rall<sup>3</sup>, Rodrigo Tavanelli Hernandez<sup>3</sup>, Simone Baldini Lucheis<sup>1</sup>, and Márcio Garcia Ribeiro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

<sup>2</sup> Department of Animal Biology, School of Biology, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Microbiology and Immunology, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

\*Correspondence author: amanda-bezerra@hotmail.com.br

**ABSTRACT**

There are more than 150,000 known species of Diptera that can serve as vector-borne about 200 pathogenic microorganisms to humans and animals, causing more than 65 diseases, including mastitis in domestic animals. Bovine mastitis is the disease that causes the major economic losses in dairy industry, and its pathogens are traditionally classified as "contagious" or "environmental" based on habitat of agents and transmission routes of agents. Despite the complexity of the species and the potential of Diptera as vector-borne of pathogens, few studies have investigated the presence of bacteria-related bovine mastitis in dipterans that inhabit the milking environment, in addition they have not used molecular methods to detect these microorganisms. In this scenario, 217 flying Diptera were collected from nine different farms (24 samples/farm) with similar milk production and management conditions. The Diptera samples were submitted for entomological identification of families and/or species. Eleven Diptera families were identified, with a predominance of Muscidae (152/217= 70%), followed by Tachinidae

(23/217=10.6%). All Diptera samples were subjected for microbiological culture using conventional (blood agar and MacConkey agar) and selective media (EC broth and chromogenic Onfarm SmartColor 2™ media), and isolates were identified in species level by mass spectrometry. Two hundred and seventy-five species of microorganisms were identified, with a predominance of pathogens-related environmental bovine mastitis (166/275=60.4%), with a higher frequency of *Enterococcus* spp. (70/275=25.4%) and *Escherichia coli* (49/275=17.8%), and a minor frequency of pathogens-related contagious bovine mastitis agents (32/275=11.6%). Non-traditional agents-related of bovine mastitis (called here as miscellaneous) were detected in 28% (77/275) of the isolates as well, identifying agents associated with human infections/intoxications, e.g., *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Acinetobacter* spp. We observed a great complexity of microorganisms carried by Diptera present in dairy cattle environment identified by mass spectrometry diagnosis method, including pathogens-related environmental and contagious bovine mastitis, as well as agents with well-known zoonotic nature associated with infections and toxi-infections from food origin; highlighting the potential of Diptera as vector-borne of the pathogens that affect animals and humans. In addition, to our knowledge, chromogenic selective media used to farm culture of bovine mastitis-related pathogens was used for the first time to selective isolation of these causal agents of mastitis among Diptera that inhabit the environment of dairy farms.

**Keywords:** Vector-borne diseases, Cattle, bovine mastitis, pathogens-related environmental and contagious mammary infections, MALDI-TOF MS

## 1 INTRODUCTION

More than 153,000 species of Diptera are known worldwide, including 10,000 genera and 188 families of flies, horseflies, and mosquitoes, of which about 8,700 are widely distributed in Brazil (BioSystematic Database of World Diptera - BDWD, 2021).

The high reproduction rate and access to contaminated environments makes the Diptera potential vector-borne of more than 200 pathogens, e.g., viruses,

bacteria, fungi, protozoa, and helminth eggs, which have been associated with more than 65 diseases in humans and domestic animals (NAZNI et al., 2005; CASTRO et al., 2008), including enteritis, dermatitis, conjunctivitis, and bovine mastitis (FÖRSTER et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014). *Musca domestica* and *Stomoxys calcitrans* species serve as potential vector-borne for bacterial pathogens-related bovine mastitis, particularly *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. (CASTRO et al., 2013, 2016).

Bovine mastitis poses the most impactful disease associated to economic losses for the dairy industry, causing a significant decrease in the production and quality of milk and its milk derivatives, premature disposal of animals and premature replacement of animals, in addition to increased costs for medications and veterinary expenses (GONÇALVES et al., 2018). Microorganisms associated with bovine mastitis are traditionally divided into contagious and environmental pathogens, based mainly on habitat of agents and transmission routes. Contagious pathogens are usually transmitted between cows during milking, whereas environmental pathogens are transmitted from own environment of farms, *i.e.*, soil, water, feces, organic matter, bed of animals, and dairy utensils (COBIRKA et al., 2020).

Despite the complexity of Diptera species (BDWD, 2021) and the potential for pathogen transmission to humans and animals (FÖRSTER et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014), few studies have focused on bovine mastitis-related pathogens presents in Diptera that inhabit the milking environment (CASTRO et al., 2016). In addition, most studies that investigated the presence of microorganisms in Diptera caught in the milking environment of cows have confirmed the diagnosis using conventional phenotypic tests (ALMEIDA et al., 2014; ALVES et al., 2018).

In this scenario, the present study investigated the presence of bovine mastitis-associated environmental and contagious pathogens, in addition bacteria relevant to human infections and toxi-infections from food origin, among corporal surface of Diptera caught in the milking environment, using conventional and selective culture media, and mass spectrometry to detection of microorganisms.

## 2 MATERIAL & METHODS

This study was carried out in accordance with the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) guidelines of the School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (protocol number 0136/2017).

### 2.1 Sample size

The sample size estimation was based on the prevalence of *E. coli*, the bacterium most commonly found in Diptera (ALVES et al., 2018), using an estimated prevalence of *E. coli* isolation of 17% (NAZNI et al., 2005; CASTRO et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014) with a 5% margin of error and 95% confidence interval. Hence, a sample size of 217 dipterans was established to the conditions of the current study. The sample size was calculated using the Open Epi program ([https://www.openepi.com/Menu/OE\\_Menu.htm](https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm)) (DEAN et al., 2013).

### 2.2 Farms

Nine dairy farms were used, of which six located in the southern region of the state of Minas Gerais and three in the southwestern region of the state of São Paulo, Brazil, where the dairy industry is common. The calves were from medium-scale farms (defined here as farm holdings between 20-200 hectares), with a different average size of herds. All the animals were breeding in the pasture, with similar conditions of nutrition, management facilities, technical degree, and sanitary conditions, including mandatory vaccines. The climate of farms sampled is characterized by tropical temperatures. The farms were eligible when met the following conditions: (1) Holstein or Holstein cross-breed cows, (2) mastitis control programs with data recorded in management software, (3) somatic cell count (SCC) < 400,000 SCC/mL (BRASIL, 2011), (4) highly productive Holstein animals (>20 liters/cow/day), (5) at least 200 lactating cows in the farm, (6) mechanical milking system, and (7) history of clinical mastitis.

### 2.3 Sample collection

Diptera were randomly collected over April 2019 and January 2020 in the milking environment (milking parlor and surrounding area, within a maximum

distance of 200 meters) in the nine farms, with preference given to flies closest to lactating animals (cows and calves).

The captures were carried out using an entomological net (butterfly trap) previously disinfected with a 10% sodium hypochlorite solution for 30 minutes before visiting the properties. Between insets collections, nets were sprayed with a 70% alcohol solution to prevent cross-contamination. Specimens were stored individually in Falcon tubes, transported at refrigeration temperature (4 to 8°C) in isothermal boxes, and stored at freezing temperature in the laboratory (-80°C) (ALVES et al., 2018). To achieve the proposed sampling, 24 insects were captured on all farms, except one farm where 25 specimens were captured.

#### **2.4 Identification of the Diptera**

Entomological identification of the specimens was performed using sterile tweezers and plates and a microscope magnifier, based on specific taxonomic keys for the orders (RAFAEL et al., 2012), families (RAFAEL et al., 2012), Diptera and Coleoptera species (ALMEIDA & MISE, 2009; CARVALHO E RIBEIRO, 2000.; CARVALHO et al., 2002; RAFAEL et al., 2012).

#### **2.5 Bacteriological culture**

After defrost, samples were transferred to sterilized glass tubes containing 3 mL of brain-heart infusion broth (BHI™ - Brain Heart Infusion, KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brazil) and incubated at 37°C for 12 hours (CASTRO et al., 2016). After turbidity, 10µL aliquots of the BHI media containing the specimens were simultaneously streaked onto conventional blood agar (5%), MacConkey agar (QUINN et al., 2011), and a commercial chromogenic selective media (Onfarm SmartColor 2™, Piracicaba, SP, Brazil) used for isolation of bovine mastitis-related pathogens in farms. All culture media mentioned above were incubated aerobically at 37°C for 72 hours, and evaluated every 24 hours for microbial growth (QUINN et al., 2011). Only samples with  $\geq$ five identical colonies isolated in any conventional or selective media were considered for further identification of agents at species level using mass spectrometry.

## 2.6 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

Identification of microorganisms at the species level was performed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker and Daltonics<sup>TM</sup>, Bremen, Germany) with a 337-nm laser. Spectra were analyzed between 2.000-20.000 m/z using FlexControl 3.3 software. Characterization of the isolates at the genus and species was considered with  $\geq 1.7$  and  $\geq 2.0$ , respectively (Barreiro et al., 2010; Gonçalves et al., 2014).

For proposal of the current study, microorganisms identified were grouped in three groups, as follows: 1) environmental and 2) contagious agents, due to relationship with bovine mastitis infections, in addition of 3) "miscellaneous" group that comprised microorganisms rarely or non-reported in bovine mastitis cases, bacteria from microbiota of Diptera, or with public health relevance.

Analysis of the entomological characterization of captured dipterans, and the detection of microorganisms was based on prevalence and descriptive values (percentage).

## 3 RESULTS

### 3.1 Diptera identification

From the 217 specimens captured in nine different farms destined for dairy production, 215 dipterans and two non-dipterans of the Apidae family were identified.

Of the total number of insects captured, eight genera/species belonging to 11 different families were identified, as follow: Muscidae (152/217=70%), Tachinidae (23/217=10.6%), Drosophilidae (11/217=5%), Sphaeroceridae (9/217=4.1%), Sepsidae (4/217=1.8%), Ulidiidae (4/217=1.8%), Syrphidae (4/217=1.8%), Chloropidae (4/217=1.8%), Calliphoridae (2/217=0.9%), Sarcophagidae (1/217=0.5%), and Piophilidae (1/217=0.5%).

In the family Muscidae, most of the insects could be identified at species level, *i.e.*, *Musca domestica* (126/152=83%), *Atherigona orientalis* (8/152=5.2%), *Brontaea* spp. (8/152=5.2%), *Stomoxys calcitrans* (5/152=3.3%), *Muscina stabulans* (2/152=1.3%), and *Haematobia irritans* (1/152=0.6%).

The four Diptera of the family Sepsidae belonged to the genus *Euxesta*, and the only one specimen from Sarcophagidae family was classified as *Microcerella halli*, whereas the other families it was possible to identify the dipterans at genus level.

Of the dipteran families identified, 20% (44/217) are relevant to phytosanitary area, *i.e.*, Tachinidae, Drosophilidae, Ulidiidae, Syrphidae, and the non-dipteran Apidae. The other families pose interest in veterinary and human medicine (Muscidae, Sphaeroceridae, Sepsidae, Calliphoridae, Chloropidae, Sarcophagidae, and Piophilidae).

### 3.2 Microbiological culture and identification of microorganisms

All 217 insect specimens were cultured. No microorganisms were isolated in 0.9% (2/217) of the specimens, while no isolates were identified by mass spectrometry in 8.7% (19/217) of the samples. Identification was successful in 90.3% (196/217) of the samples, of which one microorganism type was identified in 60.8% (132/217) of the samples, two microorganisms in 22.11% (48/217), and between 3 and 4 microorganisms in 7.4% (16/217), comprising 275 isolates.

Table 1 summarize the prevalence of the microorganisms identified, stratified here in contagious or environmental bovine mastitis-related agents, in addition a miscellaneous group. Among the identified isolates, the most frequent microorganisms were *Enterococcus* species (70/275=25.4%), *Escherichia coli* (49/275=17.8%) and *Staphylococcus sciuri* (25/275=9%) (Table 1). Species of staphylococci were identified in 11.6% (32/275) among all Diptera. Other microorganisms identified were represented by *Enterobacter* spp. (17/275=6.2%), *Klebsiella* spp. (14/275=5.1%), *Bacillus cereus* (13/275=4.3%), *Pantoea* spp. (12/275=4.3%), *Weissella* spp. (9/275=3.3%), *Acinetobacter* spp. (6/275=2.2%), *Lactococcus* spp. (6/275=2.2%), *Stenotrophomonas maltophilia* (5/275=2%), and *Pseudomonas* spp. (5/275=2%).

Table 2: Prevalence of environmental and contagious agents-related bovine mastitis detected from corporal surface of dipterans captured in the milking environment, diagnosed by mass spectrometry\*. Brazil, 2019-2020.

	Microorganisms	N/Total number of isolates(%)
environmental	<i>Enterococcus</i> spp.	70/275 (25,4%)
	<i>Escherichia coli</i>	49/275 (17,8%)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/275 (4,0%)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7/275 (2,5%)
	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	6/275 (2,1%)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Pseudomonas fulva</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Escherichia hermannii</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Proteus mirabilis</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Klebsiella variicola</i>	3/275 (1,9%)
	<i>Escherichia vulneris</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Escherichia fergusonii</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1/275 (0,4%)
	subtotal	166/275 (60,4%)
Contagious	<i>Staphylococcus sciuri</i>	25/275 (9,0%)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Staphylococcus xylosum</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Staphylococcus simulans</i>	1/275 (0,4%)
	subtotal	32/275 (11,6)
Miscellany	<i>Bacillus cereus</i>	13/275 (4,3%)
	<i>Pantoea</i> spp.	12/275 (4,3%)
	<i>Weissella</i> spp.	9/275 (3,3%)
	<i>Acinetobacter</i> spp.	6/275 (2,2%)
	<i>Lactococcus</i> spp.	6/275 (2,2%)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5/275 (2%)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	4/275 (1,4%)
	<i>Bacillus megaterium</i>	3/275 (1%)
	<i>Lysinibacillus</i> spp.	3/275 (1%)
	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	3/275 (1%)
	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	3/275 (1%)
	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	2/275 (0,7%)
	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Comamonas kerstersii</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Kurthia gibsonii</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Pluribacter pyrinus</i>	1/275 (0,4%)
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1/275 (0,4%)
<i>Bacillus oleronius</i>	1/275 (0,4%)	
<i>Candida rugosa</i>	1/275 (0,4%)	
<i>Trichosporon asahii</i>	1/275 (0,4%)	
	subtotal	77/275 (28%)
	Total	275 (100%)

\* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight = MALDI-TOF MS; N=frequency of isolates; %=percentage.

### 3.3 Distribution of microorganisms-related bovine mastitis

#### 3.3.1 Environmental

Microorganisms associated with bovine mastitis from environmental origin predominated in Diptera (166/275=60.4%), with a higher frequency of *Enterococcus* spp. (70/275=25.4%), *Escherichia coli* (49/ 275=17.8%), and *Enterobacter* spp. (17/275=6.2%). A wide variety of *Enterococcus* species was identified, including *E. faecalis* (29/70=41%), *E. faecium* (27/70=38.6%), *E. hirae* (04/70=5.7%), *E. casseliflavus* (03/70=4%), *E. sulfureus* (01/70=1%), *E. durans* (02/70=3%), *E. gallinarum* (02/70=3%), *E. avium* (01 /48=1%), and *E. thailandicu* (01/48=1%).

Other enterobacteria and gram-negative bacteria related to bovine mastitis from environmental nature were identified as well, including *Klebsiella* spp. (14/275=5.1%), *Pseudomonas* spp. (5/275=2%), *Proteus mirabilis* (4/275=1.4%), *Escherichia hermani* (4/275=1.4%), *Escherichia vulneris* (2/275=1.9%), and *Escherichia ferguoni* (1/275=0.4%).

#### 3.3.2 Miscellaneous

Microorganisms grouped in miscellaneous were the second most frequent category of agents (77/275=28%) identified among Diptera. Twenty different species of microorganisms were identified, of which *B. cereus* (13/275=4.7%), *Pantoea* spp. (12/275=4.3%) and *Weissella* spp. (9/275=3.3%) were the most frequent. Other microorganisms identified in this miscellaneous group belonged to the genera *Acinetobacter*, *Lysinibacillus*, and *Lactococcus*, in addition to isolates of the species *Stenotrophomonas maltophila*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Loddoromyces elongisporum*, *Ochorobactrum intermedium*, *Arthrobacter gandavensis*, *Comamonas kerstersii*, *Kurthia gibsonii*, *Pluribacter pyrinus*, *Wolh chitiniclastica*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus oleronius*, *Candida rugosa*, and *Trichosporon asahii*. In addition, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Acinetobacter* spp., *Ochorobactrum intermedium*, and *Comamonas kerstersii* identified here deserve attention due to relationship with infections and intoxications in humans.

### 3.3.3 Contagious

Pathogens isolated from dipterans related to contagious bovine mastitis (32/275=11.6%) were less frequently, of which only staphylococcal species were detected, with a predominance of *Staphylococcus sciuri* (25/275=9%), and a minor occurrence of *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosum*, and *S. simulans*.

### 3.3.4 Relationship between Diptera and identification of microorganisms related to bovine mastitis

The main microorganisms detected in Diptera were seen with a predominance of enterobacteria group, *i.e.*, *Enterococcus* species (47/156=30%) and *Escherichia coli* (30/156=19.2%), related to clinical bovine mastitis from environmental nature.

The family Muscidae was predominant among the Diptera captured and revealed a highest number of identified isolates (152/217=70%), of which 66.1% were classified as environmental pathogens-related bovine mastitis (123/186), 23% as miscellaneous (43/186), and 10.7% as contagious pathogens-related bovine mastitis (20/186). Of all *Musca domestica* specimens, 156 isolates were obtained, of which 66.6% were classified as environmental pathogens-related bovine mastitis (104/156), 23% as miscellaneous (36/156), and 10.2% as contagious pathogens-related bovine mastitis (16/156). Among other insects belonging to the family Muscidae, 27 isolates also revealed predominance of enterobacteria as *Enterococcus* spp. (7/27=26%), *E. coli* (6/27=22%) and *Klebsiella* spp. (5/27=13%).

Tachinidae was the second family with the highest number of dipterans captured (23/217=10.6%) with 38 isolates identified, of which 52.6% were classified as miscellaneous (20/38), 31.5% as environmental pathogens-related bovine mastitis (12/38), and 15.7% as contagious agents-related bovine mastitis (6/38). In this group of insects, *Weissella* spp. (5/38=13%), *Staphylococcus sciuri* (4/38=10.5%), and *E. coli* (5/38=13%) were most common, while the only agents from fungi origin identified along the study, *i.e.*, *Candida rugosa* (1/38=2.6%) and *Trichosporon asahii* (1/38=2.6%), belonged the family Tachinidae.

From the family Drosophilidae, 16 bacterial isolates were identified from 11 (11/217=5%) Dipterans, with a predominance of staphylococci (5/16=31.2%).

Among the other nine families (Sphaeroceridae, Sepsidae, Ulidiidae, Syrphidae, Calliphoridae, Chloropidae, Sarcophagidae, Piophilidae, and Apidae), 35 isolates were recovered from 31 Diptera specimens, of which enterobacteria and/or agents from environmental nature were predominant as well, such as *Enterococcus* spp. (11/35=31%), *E. coli* (6/35=17%), and *Enterobacter* spp. (5/35=14%).

Table 2 summarizes the entomological classification of the captured dipterans and the microorganisms identified by mass spectrometry, focusing on contagious and environmental pathogens-related bovine mastitis.

Among Diptera specimens with the main interest for plant health (Tachinidae, Drosophilidae, Ulidiidae, Syrphidae, and the non-dipteran Apidae) the predominant microorganisms identified were miscellaneous group (29/64=45,3%), whereas those relevant to animal and human health (Muscidae, Sphaeroceridae, Sepsidae, Calliphoridae, Chloropidae, Sarcophagidae, and Piophilidae) was seen a predominance of enterobacteria or agents from environmental habitat (143/211=67.7%).

1 Table 2. Entomological identification of dipterans captured in milking environment of dairy farms with emphasis in environmental  
 2 and contagious agents-related to bovine mastitis. Brazil, 2019-2020.

Diptera family	Diptera identified by family N/Total(%)	Diptera species	Diptera species identified by family N/Total(%)	environmental	N/Total number of isolates by dipteran species (%)	Contagious	N/Total number of isolates by dipteran species (%)	Miscellany	N/Total number of isolates by dipteran species (%)	
Muscidae	152/217 (70%)	<i>Musca domestica</i>	126/152 (83%)	<i>Enterococcus</i> spp.	47/156 (30,1%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	12/156 (7,7%)	<i>Bacillus cereus</i>	8/156 (5,1%)	
				<i>Escherichia coli</i>	30/156 (19,2%)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2/156 (1,2%)	<i>Weissella</i> spp.	3/156 (1,9%)	
				<i>Enterobacter cloacae</i>	6/156 (3,8%)	<i>Staphylococcus simulans</i>	1/156 (0,6%)	<i>Lactococcus</i> spp.	3/156 (1,9%)	
				<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	4/156 (2,5%)	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1/156 (0,6%)	<i>Bacillus</i> spp.	3/156 (1,9%)	
				<i>Escherichia hermannii</i>	4/156 (2,5%)			<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2/156 (1,2%)	
				<i>Escherichia vulneris</i>	2/156 (1,2%)			<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	2/156 (1,2%)	
				<i>Proteus mirabilis</i>	3/156 (1,9%)			<i>Arthrobacter gandavensis</i>	1/156 (0,6%)	
				<i>Pseudomonas fulva</i>	1/156 (0,6%)			<i>Lodderomyces elongisporum</i>	1/156 (0,6%)	
				<i>Klebsiella variicola</i>	2/156 (1,2%)			<i>Acinetobacter baylyi</i>	1/156 (0,6%)	
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4/156 (2,5)			<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2/156 (1,2%)	
				<i>Escherichia fergusonii</i>	1/156 (0,6%)			<i>Pantoea</i> spp.	6/156 (3,4%)	
								<i>Alcaligenes faecalis</i>	1/156 (0,6)	
								<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	3/156 (1,9)	
								104/156 (66,6%)	16/156 (10,2%)	36/156 (23%)
				<i>Atherigona orientalis</i>	8/152 (5,2%)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2/7 (28,6%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/7 (14,3%)	<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Escherichia coli</i>	1/7 (14,3%)			<i>Ochrobactrum grignonense</i>	1/7 (14,3%)			
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/7 (14,3%)							
			4/7 (57,1%)				2/7 (28,6%)			
<i>Brontaea</i> sp.	8/152(5,2%)	<i>Escherichia coli</i>	3/10 (30%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/10 (10%)	<i>Comamonas kerstersii</i>	1/10 (10%)			
		<i>Enterococcus</i> spp	4/10 (40%)			<i>Pantoea ananatis</i>	1/10 (10%)			
			7/10(70%)				2/10 (20%)			
<i>Stomoxys calcitrans</i>	5/152 (3,3%)	<i>Escherichia coli</i>	1/5 (20%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/5 (20%)	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	1/5 (20%)			
		<i>Enterobacter cloacae</i>	1/5 (20%)							
		<i>Enterococcus faecium</i>	1/5 (20%)							
			3/5 (60%)				1/5 (20%)			
<i>Muscina stabulans</i>	2/152 (1,3%)	<i>Enterococcus faecium</i>	1/2 (50%)			<i>Acinetobacter</i> spp.	1/2 (50%)			
<i>Haematobia irritans</i>	1/152 (0,6%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (100%)							
sp. (Not identified)	2/152 (1,3%)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/5 (20%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/5 (20%)	<i>Pluralibacter pyrinus</i>	1/5 (20%)			
		<i>Enterococcus faecalis</i>	1/5 (20%)							
		<i>Escherichia coli</i>	1/5 (20%)							
			3/5 (60%)				1/5 (20%)			
<b>Total number of isolates per family</b>				environmental	123/186 (66,1%)	Contagious	20/186 (10,7%)	Miscellany	43/186 (23,1%)	

3

4

Tachinidae	23/217 (10,6%)		<i>Escherichia coli</i>	5/38 (13,1%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	4/38 (10,5%)	<i>Weissella</i> spp.	5/38 (13,1%)	
			<i>Enterococcus</i> spp.	3/38 (7,9%)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1/38 (2,6%)	<i>Pantoea</i> spp.	3/38 (7,9%)	
			<i>Pseudomonas fulva</i>	1/38 (2,6%)	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1/38 (2,6%)	<i>Acinetobacter</i> spp.	3/38 (7,9%)	
			<i>Pseudomonas monteilii</i>	1/38 (2,6%)			<i>Bacillus cereus</i>	2/38 (5,3%)	
			<i>Proteus mirabilis</i>	1/38 (2,6%)			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2/38 (5,3%)	
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1/38 (2,6%)			<i>Lactococcus</i> spp.	2/38 (5,3%)	
							<i>Bacillus licheniformis</i>	1/38 (2,6%)	
							<i>Candida rugosa</i>	1/38 (2,6%)	
							<i>Trichosporon asahii</i>	1/38 (2,6%)	
				12/38 (31,5%)		6/38 (15,7%)		20/38 (52,6%)	
Drosophilidae	11/217 (5%)		<i>Enterococcus</i> spp.	2/16 (12,5%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	4/16 (25%)	<i>Bacillus cereus</i>	2/16 (12,5%)	
			<i>Escherichia coli</i>	2/16 (12,5%)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1/16 (6,28%)	<i>Pantoea agglomerans</i>	1/16= (6,28%)	
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/16 (6,25%)			<i>Bacillus licheniformis</i>	1/16= (6,28%)	
							<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1/16= (6,28%)	
							<i>Bacillus megaterium</i>	1/16= (6,28%)	
				5/16 (31,2%)		5/16 (31,2%)		6/16 (37,5%)	
Sphaeroceridae	9/217 (4,1%)		<i>Enterococcus</i> spp.	5/9 (55,5%)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1/9 (11,1%)	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1/9 (11,1%)	
			<i>Pseudomonas fulva</i>	1/9 (11,1%)			<i>Weissella cibaria</i>	1/9 (11,1%)	
				6/9 (66,7%)		1/9 (11,1%)		2/9 (22,2%)	
Sepsidae	4/217 (1,8%)		<i>Escherichia coli</i>	2/5 (40%)			<i>Acinetobacter junii</i>	1/5 (20%)	
			<i>Enterococcus</i> spp.	2/5 (40%)				1/5 (20%)	
				4/5 (80%)				1/5 (20%)	
Ulidiidae	4/217 (1,8%)	<i>Euxesta</i> sp.	<i>klebsiella variicola</i>	1/5 (20%)			<i>Kurthia gibsonii</i>	1/5 (20%)	
			<i>Escherichia coli</i>	1/5 (20%)			<i>Bacillus licheniformis</i>	1/5 (20%)	
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1/5 (20%)				2/5 (40%)	
				3/5 (60%)					
Syrphidae	4/217 (1,8%)		<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2/6 (33,3%)			<i>Lactococcus lactis</i>	1/6 (16,7%)	
			<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/6 (16,7%)			<i>Pantoea agglomerans</i>	1/6 (16,7%)	
			<i>Enterococcus faecalis</i>	1/6 (16,7%)				2/6 (33,4%)	
				4/6 (66,7%)					
Chloropidae	4/217 (1,8%)		<i>Pseudomonas fulva</i>	1/4 (25%)					
			<i>Escherichia coli</i>	3/4 (75%)					
				4/4 (100%)					
Calliphoridae	2/217 (0,9%)		<i>Enterobacter cloacae</i>	1/2 (50%)					
			<i>Enterococcus faecalis</i>	1/2 (50%)					
				2/2 (100%)					
Não diptero (Apidae)	2/217 (0,9%)						<i>Bacillus licheniformis</i>	1/1 (100%)	
Sarcophagidae	1/217 (0,5%)	<i>Microcerella halli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	1/2 (50%)					
			<i>Enterococcus faecalis</i>	1/2 (50%)					
				2/2 (100%)					
Piophilidae	1/217 (0,5%)		<i>Enterococcus faecalis</i>	1/1 (100%)					
			<b>Total of isolates</b>	environmental	166/275 (60,4%)	Contagious	32/275 (11,6%)	Miscellany	77/275 (28%)

5

6

N = frequency of Diptera and isolates/Total number of Diptera and isolates (%)

## 4 DISCUSSION

A high complexity of microorganisms isolated from corporal surface of dipterans captured in the milking environment was observed in farms sampled, with a predominance of enterobacteria-related bovine mastitis, in addition to contagious bacteria-related bovine mastitis, micro-organisms associated with corporal microbiota of insects, and pathogens zoonotic behavior, highlighting the issue of Diptera as vector-borne of the pathogens for both animals and humans.

There are more than 150,000 known species of Diptera (BDWD, 2021), which are characterized by their high flight capacity, proliferation, and access to contaminated environments. These features can favor the transmission of pathogens of bacterial, parasitic, and viral origin, in addition parasite eggs that can infect animals and humans (NAZNI et al., 2005), including the mammary gland of cows (CASTRO et al., 2013, 2016).

Despite the great diversity of microorganisms found in the present study, only eight genera/species of Diptera and one non-Diptera species belonging to 11 families were entomologically classified. This finding could be attributed to the high complexity of the anatomical features required for the classification of these insects (CARVALHO et al., 2002; RAFAEL et al., 2012), as well as the non-recognition of several genera/species, a fact that could be considered a limitation of the current study.

Diptera from the family Muscidae predominated among the insects captured. This result could be due to the proximity of these hematophagous insects of domestic animals, or through the consumption of organic material (RAFAEL et al. 2009), which is abundant around the milking environment.

*Musca domestica*, a well-known Diptera of the family Muscidae, was the predominant species identified among farms sampled. Similar studies have also described the high frequency of this insect (ALMEIDA et al. 2014.; ARSENOPOULOS et al. 2018), probably due to its synanthropic lifestyle and high biotic potential compared to other dipteran species (CASTRO et al. 2008).

The external corporal microbiota of dipterans is closely related to feeding and reproductive habits, and can be conventionally divided into insects with phytosanitary interests or with animal and humans' relevance (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018). A predominance of enterobacteria in Diptera families

with interest in animals (Muscidae, Sphaerocidae, Sepsidae, Ulidiidae, Chloropidae, Calliphoridae, Sarcophagidae, Piophilidae) was seen in the current study, including pathogens previously related to cases of bovine mammary infections by environmental agents (SHUKKEN et al., 2012; RUEGG, 2017). Conversely, pathogens classified as miscellaneous were found more frequently in Diptera families with major phytosanitary interest (Tachinidae, Drosophilidae, Ulidiidae, and Syrphidae) (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018) although, by convenience, were grouped here in miscellaneous agents some pathogens related to infections and toxic infections in humans from feed origin.

A study compared the microbiota of the synanthropic dipterans *Chrysomya megacephala* and *Musca domestica* from rural, urban, and natural environments, and observed differences in the microbiota related to the habitat of insects. However, they revealed a similar microbiota probably because these dipteran species had the same breeding and feeding habits (JUNQUEIRA et al., 2017). In fact, the variation of the external corporal microbiota of dipterans is directly influenced by the species' habits and the environmental conditions (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018).

Bovine mastitis is the major disease that affects dairy industry (SANTOS and FONSECA, 2019). The causative agents of bovine mastitis are conventionally divided into contagious and environmental pathogens based mainly on the habitat of the microorganism and the routes of transmission. Contagious pathogens, e.g., staphylococci, streptococci, corynebacteria, and mycoplasma, are usually transmitted between cows at milking, and have been predominantly associated with subclinical, chronic, or persistent mastitis. In contrast, environmental pathogens, such as enterobacteria, fungi, algae, and certain actinomycetes and streptococci, are transmitted to the mammary gland through the soil, water, vegetation, organic matter, animal bedding, and contaminated utensils, and are commonly associated with clinical cases of short duration, occasionally with high severity (SHUKKEN et al., 2012; RUEGG, 2017).

In addition to the environment, *Enterococcus* species are also found in the gastrointestinal tract of humans and animals. This group of microorganisms has revealed an opportunistic behavior to animals and human's infections, and usually

are refractory to conventional antimicrobial therapy (GAO et al., 2019), including species isolated from dipterans (AKHTAR et al., 2009).

*Enterococcus* species represented the most frequent genus of microorganisms found in the present study. In contrast, a similar study in Brazil, which investigated bacteria from flies in the milking environment using conventional phenotypic methods to identification of microorganisms, a low incidence of *Enterococcus* (0.62%) was found (CASTRO et al., 2008). This discrepancy of results could be justified by the use of selective media in the present study, such as EC broth and the three-part chromogenic selective medium Onfarm SmartColor 2™, developed for the microbial culture and diagnosis of specific pathogens of bovine mastitis in own farms to facilitate decisions on treatment and control approaches (GRANJA et al., 2021). The use of this chromogenic selective media in the current study probably favored the isolation of enterobacteria from insects that are associated with bovine mastitis. Moreover, the classification of isolates by mass spectrometry, which has a high specificity in species detection of bacteria, including those related to bovine mastitis (GONCALVES et al., 2014), probably increased our discriminative power. In this regard, certain *Enterococcus* species show phenotypic similarity with *Streptococcus* species (*i.e.*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis*), may lead to misdiagnosis of *Enterococcus* species using non-molecular methods (BRAGA et al., 2018).

Among the Diptera captured, 80% of the isolates of the genus *Enterococcus* belonged to the species *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. These two species have been already described as predominant in intramammary infections of cattle caused by *Enterococcus* species (GUIMARÃES et al., 2020; YOON et al.; 2021). Thus, our findings suggest that Diptera may serve as vector-borne of *Enterococcus* species associated with clinical mastitis in cows.

*E. coli* belongs to the intestinal microbiota of humans and animals. It is a well-known bacterium widely distributed in the environment, and associated with opportunistic enteric and extraenteric infections in both humans and animals. The pathogen is characterized by a high diversity of virulence factors (KAPER et al., 2004). In cattle, it is the most frequent enterobacteria involved in clinical cases of environmental mastitis, sometimes with high severity (GUERRA et al., 2020).

In the sampled farms, *E. coli* was the second most common microorganism (17.8%) identified, which is consistent with previous studies in which the pathogen was also isolated from Diptera captured in the milking environment (NAZNI et al., 2005; CASTRO et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014). In addition, the presence of Shiga toxin-producing genes (STEC) was identified in 13% of *E. coli* isolates obtained from Diptera, indicating also an occupational human risk due to common presence of these insects in the milking environment (CASTRO et al., 2013).

In addition to *E. coli*, other species of the genus *Escherichia* were also detected in the Diptera of the present study, i.e., *E. hermannii*, *E. vulneris*, and *E. fergusonii*. These species have been occasionally identified in human infections, such as bacteremia, urinary tract infections, encephalitis, and sepsis (IOANNOU, 2019). Despite scarce knowledge of the pathogenicity in domestic animals, these “other” *Escherichia* species have been detected in low prevalence in clinical bovine mastitis when molecular methods are used for the diagnosis, such as MALDI-TOF or genetic sequencing (GUTIÉRREZ-CHÁVEZ et al., 2016.; JAHAN et al., 2021).

*Klebsiella* species, particularly *Klebsiella pneumoniae*, represent another group of microorganisms found in the soil, manure, water, and bedding of cows, and have been associated with a set of clinical infections in domestic animals (RIBEIRO et al., 2022) and humans. In cattle, *Klebsiella* spp. are primary causative agents of clinical mastitis and commonly present systemic signs (COBIRKA et al., 2020.; RIBEIRO et al., 2022). In herds from China, *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* were seen as the most common species isolated from clinical cases of bovine mastitis (CHENG et al., 2020). Likewise, these species were also frequent in the present study, suggesting that dipterans may serve as potential vectors of these pathogens in the milking environment (ALMEIDA et al., 2014).

It is worth noting that although *Klebsiella* species have been classically known as a cause of environmental bovine mastitis, a binary profile of the pathogen, i.e., a contagious behavior in herds has also been observed using molecular methods; a fact that pose a new challenge to control and prophylactic approaches of bovine mastitis caused by *Klebsiella* species (KLAAS and ZADOCKS, 2017).

In addition to enterobacteria species, other opportunistic gram-negative bacteria related to bovine environmental mastitis, such as *Enterobacter*, *Pseudomonas*, and *Proteus*, were identified as well. This result is consistent with

studies conducted in Brazil (CASTRO et al., 2008), which also investigated the presence of enterobacteria and other gram-negative bacteria in the body region of Diptera captured in milking environments, reinforcing the risk of transmission by Diptera of bacteria associated with clinical bovine mastitis.

*Trueperella pyogenes* are well-known bacteria with opportunistic lifestyle, that infect mammary glands of cows, so called "summer mastitis". This designation is attributed to an increase in mastitis cases during periods of high temperatures and rainfall, which favor the proliferation of Diptera in the milking environment (RIBEIRO et al., 2015). Based on these epidemiological characteristics, the isolation of this pathogen on sampled farms would be expected. Nonetheless, the presence of *T. pyogenes* isolates was not observed in the captured dipterans. The absence of isolation of *T. pyogenes* in dipterans from milking environments was also reported in a similar study in Greece (ARSENOPOULOS et al., 2018), highlighting that the body microbiota of dipterans is closely related to environmental and reproductive conditions (JUNQUEIRA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018), or even to the presence of certain dipteran species (CHIRICO et al., 1997).

Fewer contagious pathogens associated with bovine mastitis were identified among the dipterans captured than compared with environmental agents related-bovine mastitis. Only staphylococcal species associated with bovine mastitis were identified in dipteran captured among the nine farms sampled (DUFOR et al., 2012), with predominance of *S. sciuri* and an absence of *Staphylococcus aureus* isolates. In contrast, *S. aureus* was found with high frequency in similar studies that investigated microorganisms in insects from environment of dairy farms (RAHUMA et al., 2005, BOUAMAMAA et al., 2010; GHALEHNOO, 2015). This result can be justified by the differences in the diagnostic methods used, environmental characteristics, and animal handling among the different regions studied, especially in the control of *S. aureus*, because the farms sampled in the current study had programs for control and elimination of chronically infected animals, including by *S. aureus*.

Unlike environmental pathogens-related bovine mastitis, contagious pathogens are usually transmitted between cows during milking, from milking equipment, or milkers, causing mainly subclinical and persistent infections (RUEGG, 2017). All staphylococcal species isolated from dipterans in the present

study have already been identified as primary agents of mastitis in cows elsewhere (ABERA et al. al., 2013; SONG et al., 2020) and Brazil (CASTRO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2014), i.e., *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. saprophyticus* and *S. xylosus*. Thus, the detection of contagious mastitis pathogens in the studied dipterans is consistent with similar studies that reported dipterans as possible vectors of these staphylococci species (BOUAMAMAA et al., 2010), which are associated with contagious bovine mastitis (DUFOUR et al., 2012).

Similar to the environmental pathogens-related bovine mastitis identified here, the On-farm SmartColor 2™ selective chromogenic medium also identified microorganisms associated with contagious bovine mastitis in the corporal surface of captured dipterans, although no *S. aureus* was detected. In fact, the On-farm SmartColor 2™ selective chromogenic medium was adapted for the first time here to use in diagnostic of bacteria associated with bovine mastitis, on the body surface of dipterans captured in the milking environment of cows on farms with a history of mastitis.

Between 2017 and 2018, the same group of researchers from Brazil investigated the etiology of clinical mastitis in cows on the same farms sampled in the current study. From 2,613 cultured milk samples, 940 isolates were obtained and identified by phenotypic methods, identifying *Streptococcus dysgalactiae* (18.4%), coagulase-negative staphylococci (16.8%), *Escherichia coli* (10.2%), *Klebsiella pneumoniae* (7.5%), *Prototeca* spp. (7.5%), *Streptococcus uberis* (4.5%), *Bacillus* spp. (5.2%), yeasts (4.0%), *Enterococcus* spp. (2.6%), *Pseudomonas* spp. (2.7%), *Enterobacter* spp. (2.0%), and fungi (1.3%) (GUIMARÃES et al., 2019). Curiously, except for *S. dysgalactiae*, *Prototeca* spp., and *S. uberis*, the other microorganisms mentioned above that were most frequently isolated from cows with clinical mastitis on farms were also identified on the corporal surface of dipterans captured in the same milking environments. This finding revealed the similarity of the microorganisms identified in cows with mastitis and the dipterans found in the milking environment and surrounding areas of farms, reinforcing the concern about these insects as potential vector-borne of pathogens-related bovine mastitis.

In the diverse group of microorganisms grouped here as miscellaneous, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, and *Pantoea* species, as well as *Candida rugosa* and *Trichosporon asahii*, have already been

described elsewhere as causative agents of mammary infections in cows (STORMS et al., 2003); SCACCABAROZZI et al., 2011; MBUK et al., 2016; AKADOUICHE et al., 2018; SONG et al., 2020; AKUSUMAWATI et al., 2021). However, due to the occasional occurrence as primary agents of bovine mastitis cases, and lack of consensus on transmission mechanisms, these microorganisms were conveniently classified as miscellaneous in the present study.

Some *Bacillus* species are found in the environment of livestock, especially in organic matter. *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. oleronius*, and *B. cereus* have previously been described in cases of mastitis by multidrug-resistant isolates, on farms with a history of milking hygiene problems (ABERA et al., 2013.; SADASHIV et al., 2014.; SONG et al., 2020). Similarly, all the *Bacillus* species mentioned above were also detected in the dipterans captured on the present study, supporting the possibility of these insects as vectors-to-cows of *Bacillus* species in the milking environment.

The genus *Lactococcus* has been widely used in food production and as probiotics for humans and animal industry. Nonetheless, with the advancement of molecular techniques, it has been reported in clinical cases of bovine mastitis, and is considered an emerging environmental pathogen of mammary infections, particularly *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* species (RODRIGUES et al., 2016). Coincidentally, both *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* were detected from corporal surface of dipterans captured in farms sampled. The low frequency of isolation of *Lactococcus* species in studies focused on Diptera captured in the milking environment and in cases of bovine mastitis may be attributed to their biochemical similarity to *Enterococcus* species, *Streptococcus dysgalactiae*, and *S. uberis* (BRAGA et al., 2018), whose differentiation is more reliable using molecular methods, such as mass spectrometry. In this context, in a study that investigated the identification of 97 suggestive isolates of *Enterococcus* species recovered from mastitis in the same farms where the dipterans were captured for the present study, *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* were identified in 10.3% 5.1% of the isolates, respectively (GUIMARÃES et al. 2020). *Candida rugosa* yeasts and the fungus *Trichosporon asahii* are microorganisms that inhabit the environment, and have been associated with infections in humans and animals. Cases of bovine mastitis by fungal and yeast have been intimately

associated with excess of feces, organic matter, and humidity in the environment, or non-rational use of antimicrobials in intramammary treatment (RUEGG, 2017). In the present study, both species from mycotic origin were identified in Diptera and, despite their low frequency among insects captured, probably the conditions of the milking environment of the sampled farms favor the multiplication of these pathogens and allow to be carrying to the animals by Diptera (SCACCABAROZZI et al., 2011; AKDOUCHE et al., 2018).

*Bacillus cereus*, *Comamonas kerstersii*, *Ochrobactrum intermedium*, *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*, *Lodderomyces elongisporus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Acinetobacter* and *Pantoea* species were detected less frequently in the present study. These microorganisms have been reported in humans and animals mainly with opportunistic behavior, especially related to hospital-acquired infections, e.g., diarrhea, septicemia, bacteremia, pneumonia, dermatitis, osteomyelitis, and urinary tract infections (JUNQUEIRA et al., 2017; ALMUZARA et al., 2017; KLOTZ et al., 2017; KLOTZ et al., 2017; ALMUZARA et al., 2017; KLOTZ et al., 2019; RYAN et al., 2020; HLADICK et al., 2021).

*Bacillus cereus* is a spore-forming bacteria that exhibit high adhesion to surfaces and great thermal resistance associated with human intoxications. They are found in raw and processed milk, and pose a significant challenge to dairy industry by reducing the useful life of products and derivatives (PORCELLATO et al., 2021). Furthermore, *B. cereus* intoxications have been associated with consumption of contaminated food, causing diarrhea, colic, and nausea in humans (OLIVEIRA et al., 2017). In the present study, the identification of *B. cereus* in dipterans captured in milking environments is consistent with a similar study (CARDOZO et al., 2009), and highlights the issue of these insects as vector-borne of pathogens with human relevance (SONG et al., 2020).

Human hospital-acquired infections by *Acinetobacter* species have deserved a special attention of the World Health Organization because of their pathogenicity and multidrug-resistance to conventional antimicrobial agents (MORRIS et al., 2019). Likewise, *Stenotrophomonas maltophilia* are emerging opportunistic bacteria associated with human hospital-acquired infections, causing sepsis, pneumonia, and severe chronic enteritis. Alternatively, the pathogen has already been described clinical and subclinical bovine mastitis cases, and isolated from cheese and raw and

pasteurized milk (OKUNO et al., 2018). In addition, *Lodderomyces elongisporus* are yeasts widely distributed in the environment, and have also been associated with severe healthcare-associated infections in humans acquired, such as endocarditis (AL-OBAID et al., 2018). Similar to our study, dipterans captured in the neonatal intensive care unit of a hospital in Brazil identified *Bacillus*, *Proteus*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* species, as well as *Staphylococcus non-aureus* (CAPEL et al., 2013), which reinforces the risks of Diptera to carry pathogens for humans, including in hospital conditions. In this context, *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* has been seen in sepsis and dermatitis in humans, commonly related to the presence of fly larvae in wounds or myiasis (HLADÍK et al., 2021).

*Ochrobacrum* species are bacteria found in water, soil, and plants. In humans, they are associated with severe opportunistic infections refractory to antimicrobial therapy, such as endocarditis and septicemia in hospitalized patients (RYAN and PEMBROKE, 2020). Also, *Comamonas kerstersii* are bacteria found in water, soil, and plants that have also been identified in multidrug-resistant infections in hospitalized humans, causing appendicitis, abscesses, and urinary tract infections (ALMUZARA et al., 2017).

*Pantoea* spp. are enterobacteria that have been isolated from plants, soils, and certain foods. *P. agglomerans* is the species most commonly isolated in humans, causing infections of joints, soft tissues, or bones secondary to traumatic tissue injuries (CRUZ et al., 2007).

*Kurthia gibsonii*, *Pluribacter pyrinus*, and *Alcaligenes faecalis* have been identified in low frequency among dipterans captured in milking environment of dairy farms. These bacteria are found in the environment, although they have not been described as primary animal pathogens, while *Weissella* species has been proposed as probiotics for therapy of chronic mastitis caused by *S. aureus* (COCK et al., 2019).

Given the potential of Diptera captured carrying environmental or contagious agents-related bovine mastitis in the milking environment of sampled farms, and the human relevance of some identified pathogens, it is necessary to adopt systematic measures to control of Diptera; which include removal daily the feces and organic matter from the milking and surrounding areas, avoid excess of humidity in the

milking environment, use of chemical and physical traps to insect control drainage of wetlands, and removal of waste near the milking area (SARWAR et al., 2015).

Then non-characterization of all species of Dipterans, and absence of simultaneous sampling of Diptera and milk of cows with clinical mastitis in the same milking environment, to compare the detection of micro-organisms, may be considered limitations of the present study.

## **5 CONCLUSIONS**

Overall, a high diversity of microorganisms were isolated from dipterans captured in the milking environment of farms sampled, with a predominance of enterobacteria-related bovine mastitis, as well as contagious bacteria-related bovine mastitis, micro-organism associated with corporal microbiota of insects, and agents with zoonotic behavior, highlighting the concern of Diptera as vector-borne of the pathogens for animals and humans.

### **Acknowledgements**

This research was supported by the Sao Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP), Brazil, grant 2015/19688-8. We thank also the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq), Brazil, for research productivity fellowship (PQ) given to Márcio Garcia Ribeiro.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

### **ORCID**

A. B. Bertolini **0000-0002-1575-6770**

## **References**

ABERA, B., LEMMA, D., ITICHA, Y (2013). Study of bovine mastites in asella government dairy farm of Oromia Regional state. South Eastern Ethiopia, 1, 134-145. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.07.003>

AKDOUCHE, L., AISSI, M., SAADI, A.J (2018). Prevalence and Identification of Yeasts Responsible for Mastitis in Dairy Cattle Farms in the Sidi Lahcene Region in the Wilaya of Sidi Bel abbes Algeria. *Adv Dairy Res*, 6, 2. DOI: 10.4172/2329-888X.1000206

AKHTAR, M., HIRT, H., ZUREK, L (2009). Horizontal Transfer of the Tetracycline Resistance Gene tetM Mediated by pCF10 Among *Enterococcus faecalis* in the House Fly (*Musca domestica* L.) Alimentary Canal. *Microb Ecol* 58, 509–518. DOI 10.1007/s00248-009-9533-9

ALMUZARA, M., BARBERIS, C., VEIGA, F., BAKAI, R., CITTADINI, R., VERA, R., OCAMPO, C., SERENA, M., COHEN, A., RAMIREZ, M.S., FAMIGLIETTI, A., STECHER, D., CASTILLO, M., VAY, C (2017). New Unusual presentations of *Comamonas kerstersii* infection. *Microbe and New Infect*, 19, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.07.003>

ALMEIDA, L. M., & MISE, K. M (2009). Diagnosis and key of the main families and species of South American Coleoptera of forensic importance. *Revista Brasileira de Entomologia*, 53, 227-244. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262009000200006>

ALMEIDA, J.L., GIUFFRIDA, R., ANDRADE, R.A.P., CHAVES, M.P (2014). Muscoid Diptera as potential vectors of bacterial agents on dairy farms in the northern region of Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias.*, 35, 6, 3127-3138. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n6p3127

ALVES, T.S., LARA, G.H.B., MALUNA, R.P., RIBEIRO, M.G., LEITE, D.S (2018). Carrier flies of multidrug-resistance *Escherichia coli* as potential dissemination agents in dairy farm environment. *Science of the total environment*. 633,1354-1351. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.304>

AL-OBAID, K., AHMAD, S., JOSEPH, L., KHAN, Z (2018). *Lodderomyces elongisporus*: a bloodstream pathogen of greater clinical significance. *New Microbes and New Infections*, 26, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.07.004>

ARSENOPOULOS, K.V., TRIANTAFILLOU, E., FILIOUSSIS, G., PAPADOPOULOS, E (2018). Fly repellency using deltamethrin may reduce intramammary infections of dairy cows under intensive management. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 61, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.001>

ARSENOPOULOS, K.V., SIOUTAS, G., TRIANTAFILLOU, E., GELASAKIS, A.I., PAPADOPOULOS, E (2021). Will fly repellency using deltamethrin reduce intramammary infections, stress and fatigue indicators of dairy ewes under intensive management. *pathogens*, 10, 232. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020232>

BioSystematic Database of World Diptera- BDWD, 2021. Atualizado agosto 2021 <http://www.diptera.org> acess em 18/10/2021.

BOUAMAMAA, L., SORLOZANO, A., LAGLAOUI, A., LEBBADI, M., AARAB, A., GUTIERREZ, J (2010). Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from *Periplaneta americana* and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4, 4, 194-201. <https://doi.org/10.3855/jidc.336>

BRAGA, P.A.C., GONÇALVES, J.L., BARREIRO, J.R., FERREIRA, C.R., TOMAZI, T., EBERLIN, M.N., SANTOS, M.V (2018). Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Pesq. Vet. Bras.* 38(4), 586-594. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4821>

BARREIRO, J.R., FERREIRA, C.R., SANVIDO, G.B., KOSTRZEWA, M., MAIER, T., WEGEMANN, B., BÖTTCHER, V., EBERLIN, M.N., SANTOS, M.V (2010). Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Dairy Sci.* 93, 5661-5667 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3614>

CAPEL, H.B., OLIVEIRA, A.G., SILVA, P.R., PELLI, A (2013). Insetos voadores que não picam como portadores de doenças patogênicas bactérias em um hospital brasileiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46, 2, 234-236. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-1173-2013>

CARVALHO, C.J.B., RIBEIRO, P.B (2000). Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 9(2), 169-173. DOI:<https://doi.org/10.12741/2675-9276.v2.e020>

CARVALHO, C.J.B., MOURA, M.O., RIBEIRO, P.B (2002). Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 46, 107-144. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262002000200001>

CASTRO, B.G., SOUZA, M.M.S., BITTENCOURT, A.J (2008). Isolamento de espécies enterobacterianas em *Stomoxys calcitrans*. *Ciência Rural*, 38, 1. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000024>

CASTRO, B. G., SOUZA, M. M. S., RÉGUA-MANGIA, A. H., BITTENCOURT, A. J (2010). Enterobacterial Microbiota on *Stomoxys calcitrans* External Surface. *Transboundary and Emerging Diseases.*, 57, 22-24. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01127.x>

CASTRO, B. G., SOUZA, M. M. S., REGUA, A. H., REGUA M, A.H., BITTENCOURT, A. J (2013). Occurrence of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22, 318. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000200052>

CASTRO, B. G., SOUZA, M. M. S., REGUA M, A.H., BITTENCOURT, A. J (2016). Genetic relationship between *Escherichia coli* strains isolated from dairy mastitis and from the stable fly *Stomoxys calcitrans*. *Pesquisa veterinária brasileira*, 36, 479-484. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000600004

CHENG, J., ZHOU, M., NOBREGA, D.B., Barkema, H.W., Xu, S., Li, M., Kastelic, J.P., Shi, Y., Han, B., Gao, J (2020): Genetic diversity and molecular epidemiology of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* mastitis on two large Chinese dairy farms. *J. Dairy Sci.* 104, 762–775. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19325>

CHIRICO, J., JONSSON, P., KJELLBERG, S.; THINTHOMAS, G. (1997). Summer mastitis experimentally induced by *Hydrotaea irritans* exposed to bacteria. *Medical and Veterinary Entomology* 11, 187-192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00312.x>

Cock. L.S., Rodríguez, O.V.P., Gómez, G.I.G (2019). Adhesion Capacity of *Weissella cibaria* to Bovine Mammary Tissue and the Effect of Bio-Sealant Topical Application on Physicochemical Properties of Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11,1293–1299. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9481-0>.

CRUZ, A.T., CAZACU, A.C., ALLEN, C.H (2007). *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 1, 1989–1992. <https://doi.org/10.1128/JCM.00632-07>

DEAN AG, SULLIVAN KM, SOE MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão. <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>, atualizado 2013/04/06, acessado 2019/02/25.

DUFOUR, S., DOHOO, I. R., BARKEMA, H. W., DESCÔTEAUX, L., DEVRIES, T. J., REYHER, K. K., ROY, J. P., SCHOLL, D. T (2012). Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. *Journal of dairy science*, Champaign, 95, 6, 3110-3124. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5164>

FÖRSTER, M., SIEVERT, K., MESSLER, S., KLIMPEL, S., PFEFFER, K (2009). Comprehensive study on the occurrence and distribution of pathogenic microorganisms carried by synanthropic flies caught at different rural locations in Germany. *Journal of Medical Entomology*, 46, 5, 1164-1666. <https://doi.org/10.1603/033.046.0526>

GAO, X.; FAN, C.; ZHANG, Z.; LI, S.; XU, C.; ZHAO, Y.; HAN, L.; ZHANG, D.; LIU, M (2019). Enterococcal isolates from bovine subclinical and clinical mastitis: Antimicrobial resistance and integron-gene cassette distribution. *Microbial Pathogenesis* , 129, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.031>

GHALEHNOO, M.R (2015). Housefly (*Musca domestica*) as Carrier of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Broiler Farms in Iran: Is it Important for Public Health. *Int J Enteric Pathog.* 3, 25688. DOI: 10.17795/ijep25688

GONÇALVES, J.L., TOMAZI, T., BARREIRO, J.R., BRAGA, P.A.C., FERREIRA, C.R., JUNIOR, J.P.A., EBERLIN, M.N., SANTOS, M,V (2014). Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology* 173, 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.028>

GONÇALVES, J.L., KAMPHUIS, C., MARTINS, C.M.M.R., BARREIRO, J.R., TOMAZI, T., GAMEIRO, A.H., HOGEVEEN, H., SANTOS, M.V (2018). Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Science*, 210, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.01.016>

GRANJA, B.M., FIDELIS, C.E., GARCIA, B.L.N., SANTOS, M.V (2021). Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 103, 9115-9129. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19513>

GUERRA, S.T.; ORSI, H., JOAQUIM, S.F., GUIMARÃES, F.F., LOPES, B.C., DALANEZI, F.M., LEITE, D.S., LANGONI, H., PANTOJA, J.C.F., RALL V.L.M., HERNANDES, R.T., LUCHEIS, S.B., RIBEIRO, M.G. Short communication: Investigation of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes, bacterial motility, and multidrug resistance pattern of strains isolated from dairy cows with different severity scores of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 2019-17477, 2020.

GUIMARAES, F. F., JOAQUIM, S.F., GUERRA, S. T., DALANEZI, F.M., LOPES, B. C., PANTOJA, J.C.F., RIBEIRO, M.G., HERNANDES, R.T., RALL, V.L.M., LANGONI, H. Etiology of clinical mastitis in high-yield farms Southeastern, Brazil. In: National Mastitis Council 58th Annual Meeting, 2019, Savannah. Annual Meeting Proceedings, 1, 186-187, 2019

GUIMARÃES, F.F., MORAES, G.N., JOAQUIM, S.F., GUERRA, S.T., DALANEZI, F.M., LOPES, B.C., PANTOJA, J.C.F., RIBEIRO, M.G., HERNANDES, R.T., RALL, V.L.M., SANTOS, M.V., LANGONI, H. Identification of *Enterococcus* spp. Isolated from Milk Samples of Clinical Mastitis. In: National Mastitis Council- NMC, nº59, Orlando- Florida. Botucatu: anais, 28-31, 195-196, 2020.

GUÉGAN, M., ZAUACHE, K., DÉMICHEL, C., MINARD, G., VAN, V.T., POTIER, P., MAVINGU, P., MORO, C.V (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* 6, 49. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0435-2>

GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, A.J., MARTÍNEZ-ORTEGA, E.A., VALENCIA-POSADAS, M., LEÓN-GALVÁN, M.F., FUENTE-SALCIDO, N.M., BIDESHI, D.K., BARBOZA-CORONA, J.E (2016). Potential use of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins to control antibiotic-resistant bacteria associated with mastitis in dairy goats. *Folia Microbiol*, 61, 11–19. DOI 10.1007/s12223-015-0404-0

HLADÍK, M., LIPOVY, B., KALOUDOVA, Y., HANSLIANOVA, M., VITKOVA, I (2021). Human Infections by *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*: A Mini-Review and the First Report of a Burn Wound Infection after Accidental Myiasis in Central Europe *Microorganisms*, 9, 1934. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091934>

IOANNOU, P. *Escherichia hermannii* Infections in Humans: A Systematic Review (2019). *Trop. Med. Infect. Dis*, 4, 17. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010017>

JAHAN, N.A., GODDEN, S.M., ROYSTER, S., SCHOENFUSS, T.C., GEBHART, C., TIMMERMAN, J., FINK, R.C (2021). Evaluation of the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system in the detection of mastitis pathogens from bovine milk samples. *Journal of Microbiological Methods* 182, 106-168. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106168>

JUNQUEIRA, A.C., RATAN, A., ACERBI, E., DRAUTZ-MOSES, A.I., BALAKRISHNAN, N. V., PREMKRISHNAN, P.I., BODO, L., RIKKY W., PAULO, D.F.; GAULTIER, N.E.; SUBRAMANIAN, P.; HASAN, N.A.; COLWELL, R.R.; BORK, P.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; BRYANT, D.A.; STEPHAN C.S (2017). The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. *Scientific Reports*, 7, 16324. DOI:10.1038/s41598-017-16353-x

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, n.2, p.123–140 <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.

KLAAS, I.C., ZADOKS, R.N (2018). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transb Emerg Dis*, 65, 166-185.

KLOTZ, P., HIGGIN, P.G., SCHAUBMAR, A.R., FAILING, K., LEIDNER, U., SEIFERT, H., SCHEUFEN, S., SEMMLER, T., EWERS, C (2019). Seasonal Occurrence and Carbapenem Susceptibility of Bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany. *Frontiers in microbiology*. 10, 272. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00272>

KUSUMAWATI, A., MUSTOPA, A.Z., WIBAWAN, I.W.T., A SETIYONO, A., SUDARWANTO, M.B (2021). Metagenomic analysis of pathogen mastitis in cow's milk from Cicurug, Sukabumi, West Java, Indonesia. *Earth and Environmental Science*, 762,12064. doi:10.1088/1755-1315/762/1/012064

MBUK, E.U., KWAGA, J.K.P., BALE, J.O.O., BORO, L.A., UMOH, J.U (2016). Coliform organisms associated with milk of cows with mastitis and their sensitivity to commonly available antibiotics in Kaduna State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 8(12), 228-236. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0522>

MORRIS, F.C., DEXTER, C., KOSTOULIAS, X., IKHTEAR M., PELEG, A.Y (2019). The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii* *Frontiers in microbiology*, 10, 1601. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01601>

NAZNI, W.A., LUKE, H., WAN ROZITA, W.M., ABDULLAH, A.G., SA'DIYAH., AZAHARI, A.H., ZAMREE, I., TAN, S.B., LEE, H.L., SOFIAN, M.A (2005). Determination of the flight range and dispersal of the house fly, *Musca domestica* (L.) using mark release recapture technique. *Tropical Biomedicine*, 22, 53–61.

OKUNO, N.T., FREIRE, I.R., SEGUNDO, R.T.R.S., SILVA, C.R., MARIN, V.A (2018). Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of *Stenotrophomonas*

maltophilia in Cheese Samples Based on the smeT Gene. *Current Microbiology*, 75, 1555–1559. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1559-0>

OLIVEIRA, E.B., TOMAIM, M.R., SILVA, S.P., TOLEDO, R.C.C (2017). CARACTERIZAÇÃO DA INTOXICAÇÃO ALIMENTAR CAUSADA PELO *Bacillus cereus*: UMA REVISÃO. *Higiene Alimentar*, 31, 268/269.

PORCELLATO, D., SKEIE, S.B., MELLEGÅRD, H., MONSHAUGEN, M., GORANSSON, S.A, AANRUD, B., LINDSTEDT, M.A., ASPHOLM, M (2021). Characterization of *Bacillus cereus* sensu lato isolates from milk for consumption; phylogenetic identity, potential for spoilage and disease. *Food Microbiology*, 93, 103604. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103604>

RAFAEL, J.A., PIMENTEL; F.S.P., GODOI, R.J.P (2009). The enigmatic genus *Ctenostylum* Macquart with the description of a new species from the Brazilian Amazon Basin and a checklist of world Ctenostylidae species (Diptera). *Zootaxa* 20, 63-68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2026.1.7>

RAFAEL, J. A., MELO, G. A. R., CARVALHO, C.J.B., CASARI, A.S., CONSTANTINO, R (2012). Chave para Ordens - Adultos. In: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. (Eds.); *Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia*. 2012, Editora Holos, 191-197 and 701-745.

RAFAEL, J. A., MELO, G.A.R., CARVALHO, C.J.B., CASARI, A.S., CONSTANTINO, R. (2012). Coleoptera. In: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. (Eds.); *Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia*. 2012 Editora Holos, 453-537.

RAHUMA, N., GHENGHESH, K. S., BEN AISSA, R., ELAMAARI, A (2005). Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99, 8, 795-802. doi: 10.1179/136485905X65134.

RIBEIRO, M.C., MORAIS A.B.C., ALVES A.C., BOLAÑOS C.A.D., PAULA, C.L., PORTILHO, F.V.R., JÚNIOR, G.V., LARA, G.H.B., MARTINS, L.S.A., MORAES, L.S., RISSETI, R.M., GUERRA, S.T., BELLO, T.S., SIQUEIRA, A.K., BERTOLINI, A.B., RODRIGUES, C.A., PASCHOAL, N.R., ALMEIDA, B.O., LISTONI, F.J.O., SÁNCHEZ, L.F.G., PAES, A.C (2022). Klebsiella-induced infections in domestic species: a case-series study in 697 animals (1997-2019). *Braz J Microbiol*, 53(1), 455-464. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00667-0>

RODRIGUES, M.X., LIMA, S.F., HIGGINS, C.H., CANNIATTI-BRAZACA, S.G., BICALHO, J (2016). The *Lactococcus* genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation. *Dairy Sci*. 99:9864–9874. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11143>

RUEGG, P (2017). Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci*. 100, 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>

RYAN, M.P., PEMBROKE, J.T (2020). The Genus *Ochrobactrum* as Major Opportunistic Pathogens Microorganisms, 8, 1797. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111797>

SADASHIV, S.O., KALIWAL, B.B (2014). Isolation, characterization and antibiotic resistance of *Bacillus* sps. from bovine mastitis in the region of north Karnataka, India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(4), 360-373.

SARWAR, M (2015). Insect Vectors Involving in Mechanical Transmission of Human Pathogens for Serious Diseases International. *Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering* 1, 3, 300-306.

SCACCABAROZZI, C., LOCATELLI, G., PISONI, G., MANAROLLA, A., CASULA, V., MORONI, P (2011). Short communication: Epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. *Dairy Sci.* 94, 4574–4577. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4294>

SCHUKKEN Y., CHUFF M, MORONI P, GURJAR A, SANTISTEBAN C, Belomestnykh N, Zadocks RN. 2012. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J Dairy Sci.* v 94, p6203-6215.

SCHUSTER, G. L., DONALDSON, J. R., BUNTYN, J. O., DUOSS, H. A., CALLAWAY, T. R., CARROLL, J. A., FALKENBERG, S.M., SCHMIDT, T. B (2013). Use of bioluminescent *Escherichia coli* to determine retention during the life cycle of the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae, L). *Foodborne pathogens and disease*, Larchmont, 10, 5, 442-447. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1326>

SONG, X., HUANGC, X., XUC, H., ZHANG, C., CHENA, S., LIUA, F., GUANA, S., ZHANGA, S., ZHUA, K., WUA, C (2020). The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. *Veterinary Microbiology*, 247, 108757. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108757>

STORMS, V., DEVRIESE, L.A., COOPMAN, R., SCHUMANN, P., VYNCKE, F., GILLIS, M (2003). *Arthrobacter gandavensis* sp. nov., for strains of veterinary origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1881–188. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02353-0>