

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MOSCA *Stomoxys calcitrans*  
(LINNAEUS, 1758) NA VEICULAÇÃO DE  
*Escherichia coli* CAUSADORA DE MASTITE BOVINA  
E OUTROS AGENTES BACTERIANOS**

**Bruno Gomes de Castro**

**2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MOSCA *Stomoxys calcitrans*  
(LINNAEUS, 1758) NA VEICULAÇÃO DE *Escherichia coli*  
CAUSADORA DE MASTITE BOVINA E OUTROS AGENTES  
BACTERIANOS**

**BRUNO GOMES DE CASTRO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Avelino José Bittencourt**

*e Co-orientação da Professora*  
**Miliane Moreira Soares de Souza**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Sanidade Animal

Seropédica, RJ  
Abril de 2008

636.208969

2

C346a

T

Castro, Bruno Gomes de, 1978-

Avaliação do papel da mosca  
Stomoxys calcitrans (Linnaeus,  
1758) na veiculação de Escherichia  
coli causadora de mastite bovina e  
outros agentes bacterianos/ Bruno  
Gomes de Castro - 2008.

82f. : il.

Orientador: Avelino José  
Bittencourt.

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 65-82

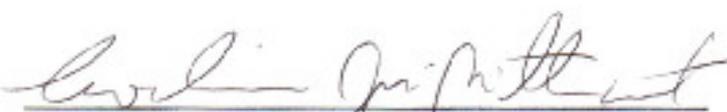
1. Mastite - Teses. 2. Mastite -  
Transmissão - Teses. 3. Bovino -  
Doenças - Teses. 4. Mosca de  
estábulo - Teses. 5. Mosca como  
transmissora de doença - Teses I.  
Bittencourt, Avelino José , 1961- .  
II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Instituto de  
Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

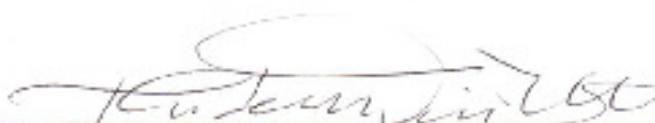
**BRUNO GOMES DE CASTRO**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

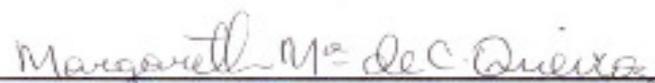
TESE APROVADA EM 01/04/2008

  
Avelino José Bittercourt, Ph. D. UFRRJ  
(Orientador)

  
Miliane Moreira Soares de Souza, Ph. D. UFRRJ  
(Co-orientadora)

  
Rubens Pinto de Mello, Ph. D. FIOCRUZ

  
Adriana Hamond Régua-Mangia, Ph. D. FIOCRUZ

  
Margareth Maria de Carvalho Queiroz, Ph. D. FIOCRUZ

*“Dê-me Senhor,  
agudeza para entender,  
capacidade para reter  
método e faculdade para aprender,  
sutileza para interpretar,  
graça e abundância para falar  
Dê-me Senhor,  
acerto ao começar,  
direção ao progredir  
e perfeição ao concluir”.*

*São Tomás de Aquino*

**Ofereço esta tese à minha  
“Família Universidade Rural”.**

## AGRADECIMENTO

Agradeço inicialmente a Deus por me iluminar todos os dias nesta caminhada, por colocar em meu caminho pessoas indescritíveis, e me dar oportunidade de ter aproveitado a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, minha segunda casa.

Agradeço a meus pais pelo apoio irrestrito durante esta caminhada que já perduram 11 anos. Sem esse apoio, esta caminhada seria um tanto mais árdua; a aos familiares (irmãos, primos, tios, etc.) que torceram por mim durante este tempo.

Agradeço ao PROFESSOR AVELINO JOSÉ BITTENCOURT pela orientação, aconselhamentos, ajuda e amizade. Muito obrigado pela confiança durante estes 10 anos de convivência e orientação. Espero ter correspondido à expectativa.

À PROFESSORA MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA, agradeço pela orientação, paciência, ensinamentos, confiança, amizade e aconselhamentos nestes seis anos de orientação.

Agradeço à DOUTORA ADRIANA HAMOND RÉGUA-MANGIA por todo apoio na fase final de meu estudo, que foi essencial na conclusão desta tese. Se hoje este estudo se conclui, isto se deve a sua ajuda, orientação e, principalmente, paciência com este iniciante e encantado pela Biologia Molecular. Juntamente venho agradecer à ROSE MARY e CARMEN do Laboratório de Epidemiologia Molecular da ENSP-FIOCRUZ pela ajuda na fase final do estudo.

Agradeço aos amigos MICHEL, JULIO, FELIPE, THAÍS, RAQUEL, CLARISSA, HENRIQUE, UIRATAN, FERNANDO, ALEXANDRE, FRANCISCO, MARIANA, ANA PAULA, PABLO e ANDRÉ pela amizade e ombro amigo que sempre esteve vago para me ouvir em dias difíceis. Agradeço a convivência com tantas outras pessoas não listadas acima.

Agradeço a minha “Família Bacteriologia” composta por SHANA, INGRID, LIDIANE, MARCELO, AMANDA, BRUNO, ISABELA e LORENA pela ajuda, compreensão e amizade. Sem vocês este trabalho seria impossível.

Às PROFESSORAS LUCILA BARBERIS, CRISTINA PÁJARO, LILIANA PASCUAL e ELINA REINOSO pela orientação e auxílio durante minha estada na UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO (ARGENTINA). Aos amigos feitos durante os três meses vividos na Argentina.

Agradeço a GILBERTO FLAUSINO e todos os funcionários do Hospital Veterinário da UFRRJ, pela ajuda com a limpeza e esterilização do material utilizado neste estudo. Vocês foram muito importantes durante todo esse caminhar.

Agradeço aos professores dos departamentos de Clínica e Cirurgia Veterinária, Parasitologia Animal e Microbiologia e Imunologia Veterinária pela ajuda e pelas idéias dadas a este trabalho.

Agradeço ao Dr. JOÃO RAMOS DA COSTA ANDRADE do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro pela cessão de amostras padrão para a realização do estudo.

Sou muito grato aos Produtores Rurais visitados, pois sem a boa vontade deles confiança em nosso trabalho, este estudo não seria possível; bem como às pessoas que me auxiliaram na coleta das amostras.

Ao Curso de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, meu sincero agradecimento. Agradeço-lhe pelo apoio que dispõe aos seus alunos pós-graduandos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa nos três primeiros anos de Doutorado e à Fundação Carlos Chagas Filho de

Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) por ter me agraciado com a Bolsa Nota 10 neste meu último ano de curso.

Agradeço à ROBERTA pela companhia, paciência e carinho durante este ano e meio, e que espero que seja eterna a sua companhia diária.

Por fim, gostaria de dizer que cada um dos citados aqui faz parte nestas linhas seqüentes.

**MUITO OBRIGADO!!!**

## BIOGRAFIA

Bruno Gomes de Castro, filho de Jayme de Almeida Castro e Gláucia Gomes de Castro, nascido em 18 de agosto de 1978, no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário, ensino fundamental e concluiu o ensino médio, em 1995, no Colégio Marista São José localizado na cidade do Rio de Janeiro.

No ano de 1996 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Foi estagiário do Hospital Veterinário de Pequenos Animais nesta instituição no período de abril a setembro de 1997. Também foi estagiário remunerado do Curral de Apreensão (Convênio UFRRJ/Polícia Rodoviária Federal) no período de outubro de 1998 a julho de 2000. Estagiou no Hospital Veterinário da UNESP/Jaboticabal de julho a agosto de 2000 e foi bolsista de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq, no período de agosto de 2000 a julho de 2001, com o estudo “Avaliação da capacidade de transmissão de bactérias causadoras de mastite por *Stomoxys calcitrans* (L.) em bovinos leiteiros” sob orientação do Professor Dr. Avelino José Bittencourt.

Foi aprovado no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da UFRRJ em 2002 e desenvolveu o estudo “Avaliação da Microbiota Bacteriana de Segmentos da mosca *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Díptera: Muscidae) em Propriedades Rurais de municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense” sob orientação do Professor Dr. Avelino José Bittencourt e como co-orientadores os Professores Dr. Gonzalo Enfraín Moya Borja e Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista de pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2002 a fevereiro de 2004.

Em 2004, foi aprovado no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ em sob orientação do Professor Dr. Avelino José Bittencourt e como co-orientadora a Professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza.

Durante os meses de abril a julho de 2006 foi estagiário na Universidad Nacional de Rio Cuarto na Argentina pelo projeto CAPES/SPU, sob orientação das Dras. Lucila Barberis, Liliana Pascual, Liliana Odierno e Elina Reinoso.

Foi bolsista de pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2004 a janeiro de 2007.

Posteriormente foi bolsista da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro de fevereiro de 2007 a fevereiro de 2008.

## RESUMO

CASTRO, Bruno Gomes. **Avaliação do papel de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) na veiculação de *Escherichia coli* causadora de mastite bovina e outros agentes bacterianos.** 2008. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Este estudo teve o objetivo de avaliar a capacidade da mosca *Stomoxys calcitrans* em veicular agentes bacterianos causadores de mastite bacteriana bovina, bem como avaliar a microbiota enterobacteriana na superfície externa, aparelho bucal e trato digestório abdominal da mosca dos estábulos; e fazer um levantamento da microbiota bacteriana nos casos de mastite bovina das propriedades visitadas. Foram coletadas amostras de leite com mastite e 20 espécimes da mosca dos estábulos em 10 propriedades visitadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, Estado do Rio de Janeiro. No Laboratório de Bacteriologia da UFRRJ foi realizado o isolamento bacteriano do leite coletado em Agar MacConkey (MC), Agar Infuso Cérebro Coração (BHI) e Manitol Vermelho de Fenol. As moscas foram lavadas individualmente em Caldo BHI, esterilizadas e, sob a luz de um microscópio estereoscópio, tinham seu aparelho bucal e conteúdo intestinal abdominal dissecado. Estas estruturas foram maceradas em Caldo BHI e após 24 horas a 37 °C repicados em Agar MC, Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e enriquecidos em Caldo Tetrionato de Sódio que após incubação, era repicado em Agar Salmonella-Shigella. Após esta etapa, cada colônia isolada era avaliada quanto às suas características morfo-tintoriais para serem identificadas através de testes bioquímicos específicos. Também foi realizado o teste de resistência antimicrobiana, com a finalidade de se verificar, as quais antibióticos as bactérias isoladas foram sensíveis. Quando havia coincidência de espécies enterobacterianas no leite e nos segmentos avaliados das moscas, se realizava a técnica de análise do polimorfismo dos segmentos de DNA obtidos por amplificação randômica (RAPD-PCR) como instrumento de avaliação da diversidade genética e das relações de clonalidade entre estas subpopulações bacterianas. De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que o leite com mastite, teve como principais agentes etiológicos as espécies *Staphylococcus aureus*, Estafilococos Coagulase Negativa (ECN) e *Escherichia coli*. Os antimicrobianos com menor taxa de resistência foram Amoxicilina/Ácido Clavulânico e Norfloxacin. Com relação à microbiota enterobacteriana verificada nos segmentos de *S. calcitrans*, foi observado que *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* e *Salmonella* spp foram as bactérias mais prevalentes. O segmento com o maior número de isolados foi a superfície externa, onde foram isoladas 73 colônias distintas (45,91%), seguida pelo aparelho bucal com 46 colônias (28,93%), e pelo trato digestório abdominal com 40 colônias isoladas (25,16%). Houve clonalidade apenas de sub-populações de *E. coli* entre as amostras de leite e de segmentos de *S. calcitrans* de uma mesma propriedade. Desta forma, foi possível observar que as moscas não veiculavam nenhuma *E. coli* causadora de mastite bovina. No que se refere às *E. coli* identificadas, foi verificado que 13,79% eram Shiga-Toxigênicos, sendo identificados os genes *stx1*, *stx2* e *eaeA*. No presente estudo, verificou-se que esta mosca tem a capacidade de veicular enterobactérias, tanto em sua superfície externa como no interior de seu corpo. O controle da mosca dos estábulos poderá contribuir para melhora na sanidade e produtividade animal.

**Palavras-chave:** *Stomoxys calcitrans*. Mastite bacteriana bovina. *Escherichia coli*

## ABSTRACT

CASTRO, Bruno Gomes. **Evaluation of the role of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) as a vehicle for bovine mastitis causative *Escherichia coli* and other bacteria agents.** 2008. 82 p. Thesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

This study had the objective of evaluating the capacity of *Stomoxys calcitrans* fly to vehicular bacterial agents causing bovine mastitis. Just as evaluate the enterobacterial microbiota on the external surface, mouth parts and abdominal digestive tract of the stable fly. And also realize a survey of the bacterial microbiota of the cases of bovine mastitis on the visited properties. There were taken mastitis milk samples and 20 specimens of stable flies on 10 visited properties in the municipality of Barra Mansa and Resende, Rio de Janeiro State. The collected milk was submitted to bacterial isolation in the laboratory of Bacteriology UFRRJ. Samples were subcultures on MacConkey (MC) agar, Brain-Heart Infusion agar (BHI) and Manitol-Phenol Red agar. The flies were individually washed in BHI broth, sterilized and had its mouth parts and abdominal intestinal content dissected under stereoscope microscope. These structures were macerated in BHI broth and, after 24 hours at 37 °C, subcultured at MC agar, Agar Eosin Methilen Blue (EMB) and enriched in Sodium Tetrathionate Broth after incubation, and were subcultured in Salmonella-Shigella agar. After this stage, each isolated colony was observed for differences in morphology as size and pigment production characteristics to be identified through biochemical specific tests. It was also realized an antimicrobial resistance test to verify to which antibiotics the isolated bacteria were sensible. When were coincidences between the enterobacterial species in the milk and on the flies evaluated segments, was realized a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) as an instrument of evaluating the genetic diversity and the eletrophoretic profile similarity the bacterial subpopulations. In agreement with the obtained results, was verified that the mastitis milk had as etiological agents specially the species *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci and *Escherichia coli*. The antimicrobials with less resistance rate were Amoxilin-Clavulanic Acid and Norfloxacin. Regarding to the enterobacterial microbiota verified on *S. calcitrans* segments, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* e *Salmonella* spp were the most prevalent bacteria. The segment with the higher number of isolations was the external surface, with 73 (45.91%) distinct colonies isolated. The mouth parts had 46 (28.93%) colonies and the abdominal digestive tract 40 (25.16%) isolated colonies. The eletrophoretic profile similarity happened just on *E. coli* subpopulations on milk samples and *S. calcitrans* segments of the same property. This way, was possible to observe that the flies do not act as a vehicle of any bovine mastitis causative *E. coli*. Regarding to the identified *E. coli*, was verified that 13.79% were Shiga Toxin-Producing, and the genes *stx1*, *stx2* and *eae* were identified. On the present study, was verified that this fly has the capacity to act as vehicle to enterobacterial, on its external surface as well as inside its body. The stable fly control may contribute to the improvement on animal productivity and sanity.

**KEY WORD:** Stable fly. Bovine Summer Mastitis. *Escherichia coli*.

## LISTA DE TABELAS

	<b>Págs</b>
<b>Tabela 1.</b> Interpretação do “California Mastitis Test” modificado por Fonseca & Santos (2000).....	17
<b>Tabela 2.</b> Sequenciamento dos iniciadores utilizados no estudo.....	27
<b>Tabela 3.</b> Dados sobre a produção leiteira das propriedades rurais visitadas no município de Barra Mansa e Resende, RJ.....	31
<b>Tabela 4.</b> Perfil de resistência, frente aos antimicrobianos avaliados, dos agentes bacterianos identificados (N=92) de leite com mastite nas amostras coletadas (N=78) de propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	37
<b>Tabela 5.</b> Prevalência da microbiota bacteriana isolada das amostras coletadas de leite com mastite das 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	38
<b>Tabela 6.</b> Frequência dos agentes isolados das amostras de leite com mastite coletadas das cinco propriedades rurais do município de Barra Mansa, RJ.....	39
<b>Tabela 7.</b> Frequência dos agentes isolados das amostras de leite com mastite coletadas das cinco propriedades rurais do município de Resende, RJ.....	39
<b>Tabela 8.</b> Frequência dos escores CMT das amostras de leite com mastite coletadas das 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	41
<b>Tabela 9.</b> Frequência dos quartos mamários CMT-positivos examinados nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	41
<b>Tabela 10.</b> Frequência de enterobactérias nos três segmentos avaliados das moscas coletadas nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	44
<b>Tabela 11.</b> Frequência de enterobactérias na superfície externa das moscas coletadas nas 10 propriedades rurais visitadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	45
<b>Tabela 12.</b> Frequência de enterobactérias verificadas no aparelho bucal das moscas coletadas nas 10 propriedades rurais visitadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	45
<b>Tabela 13.</b> Frequência de enterobactérias verificadas no trato digestório abdominal das moscas coletadas nas 10 propriedades rurais visitadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	46
<b>Tabela 14.</b> Amostras de <i>Escherichia coli</i> identificadas de leite com mastite e das moscas coletadas nas propriedades rurais visitadas dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	53

## LISTA DE QUADROS

	<b>Págs</b>
<b>Quadro 1.</b> Dados referentes à identificação dos animais, propriedade visitada, quarto mamário com mastite, escore no teste “California Mastitis Test” (CMT) e agente identificado em amostras de leite com mastite, coletadas nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	35

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Págs</b>
<b>Figura 1.</b> Mapa geopolítico do estado do Rio de Janeiro, destacando-se os municípios de Resende e Barra Mansa e a microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, visitados no presente estudo.....	14
<b>Figura 2.</b> Moscas sendo identificadas em microscópio estereoscópio próximo a Bico de Bunsen em Capela de Exaustão.....	16
<b>Figura 3.</b> Instrumental para a dissecação das moscas coletadas, pinças retas lisas de 10 centímetros (A), pinças modelo Graefe serrilhada reta de sete centímetros (B), e tesoura modelo Castroviejo curva de 10 centímetros (C).....	18
<b>Figura 4.</b> Abdome (vista ventral) separado do tórax das moscas dos estábulos coletadas em municípios do vale do Paraíba Fluminense, onde estão destacados com setas os pontos onde são feitas as incisões (entre os segmentos abdominais quatro e cinco) com o auxílio de agulhas hipodérmicas.....	18
<b>Figura 5.</b> Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) com colônias características de <i>Escherichia coli</i> , centro negro e brilho verde metálico.....	20
<b>Figura 6.</b> Resultados do Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) nos isolados bacterianos das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, RJ.....	20
<b>Figura 7.</b> Resultados do Teste SIM nos isolados bacterianos das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, RJ.....	21
<b>Figura 8.</b> Prova da fermentação de açúcares realizada para identificação bacteriana das colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletados em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado negativo (A) e resultado positivo (B).....	21
<b>Figura 9.</b> Prova de Voges Proskauer (VP) realizada para identificação bacteriana das colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletados em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado negativo (A) e resultado positivo (B).....	22
<b>Figura 10.</b> Prova de Vermelho de Metila (VM) realizada para identificação bacteriana das colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletados em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B).....	22

<b>Figura 11.</b> Prova da produção de gelatinase, realizada para identificação de colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado positivo (A) e negativo (B).....	23
<b>Figura 12.</b> Prova da degradação do citrato, realizada para identificação de colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado positivo (A) e negativo (B).....	23
<b>Figura 13.</b> Agar Infuso Cérebro Coração (BHI) (A); Agar MacConkey (MC) (B) e Agar Manitol Vermelho de Fenol (MVF) (C) utilizados para isolamento bacteriano das amostras de leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense.....	25
<b>Figura 14.</b> Áreas de olericultura com irrigação artificial em propriedades rurais no Distrito de Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ.....	30
<b>Figura 15.</b> Animais apresentando área de alopecia nas extremidades dos membros (A) e sacos com cama de frango na entrada do curral (B) em propriedade rural no Distrito de Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ .....	33
<b>Figura 16.</b> Propriedade rural onde foi verificado acúmulo de fezes no curral e baixo nível de higiene na ordenha em Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ.....	33
<b>Figura 17.</b> Número de colônias isoladas nos três segmentos estudados das moscas coletadas nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	43
<b>Figura 18.</b> Frequência de isolamento de enterobactérias entre os segmentos da mosca dos estábulos capturadas nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.....	43
<b>Figura 19.</b> Perfil eletroforético das amostras de <i>Escherichia coli</i> identificadas obtidas com o iniciador A04. As colunas PM representam o peso molecular (1 Kb), as setas apontam para fragmentos de 3,054 bp (superior) e 396 bp (inferior)..	54
<b>Figura 20.</b> Perfil eletroforético das amostras de <i>Escherichia coli</i> identificadas obtidas com o iniciador 1254. As colunas 1, 18, 27 e 47 representam o peso molecular (1 Kb).....	56
<b>Figura 21.</b> Perfil eletroforético das amostras de <i>Escherichia coli</i> identificadas obtidas com o iniciador M13. As colunas PM representam o peso molecular (1 Kb) e as setas apontam para fragmentos de 3,054 bp (superior) e 396 bp (inferior).....	57
<b>Figura 22.</b> Perfil eletroforético organizado por grau de similaridade genética de todas as amostras de <i>Escherichia coli</i> obtidas pelo iniciador A04.....	58
<b>Figura 23.</b> Dendrograma das amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de leite das	

propriedades visitadas, frente aos diferentes iniciadores, sendo a amostra 19 a única referente à mastite clínica..... 59

**Figura 24.** Gel de Agarose com as amostras STEC positivas, onde a coluna 1 representa o Peso Molecular (100 bp); 2: amostra padrão E40705 (*stx1* e *eae* +); 3: amostra padrão E30121 (*stx2* e *eae* +); 4: Amostra 5.14; 5: Amostra 5.17; 6: Amostra 6.28; 7: Amostra 6.29; 8: Amostra 6.30; 9: Amostra 7.31; 10: Amostra 7.32; 11: Amostra 7.40..... 61

## LISTA DE ABREVIACOES

**STEC:** *Escherichia coli* Shiga-Toxigênicas

**BHI:** Infuso Cérebro Coração

**MC:** Agar MacConkey

**MVF:** Agar Manitol Vermelho de Fenol

**EMB:** Agar Eosina Azul de Metileno

**SS:** Agar Salmonella Shigella

**Sup. Externa:** Superfície Externa das moscas dos estábulos coletadas no estudo

**Ap. Bucal:** Aparelho bucal dissecado das moscas dos estábulos coletadas no estudo

**CMT:** California Mastitis Test

**ECN:** Estafilococos Coagulase Negativos

**PCR:** Reação de Polimerase em Cadeia

**RAPD-PCR:** Amplificação Randômica do DNA Polimórfico - Reação de Polimerase em Cadeia

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Transmissão de Microrganismos por Dípteros Muscóides.....	3
2.2. Transmissão de Agentes Patogênicos por <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	4
2.3. Transmissão de agentes bacterianos.....	6
2.4. Associação da Mastite Bacteriana Bovina com Dípteros Muscóides.....	9
2.5. Mastite Bacteriana Bovina.....	9
2.5.1. Importância da mastite no Brasil.....	11
2.6. Associação de <i>Escherichia coli</i> e Mastite Bacteriana Bovina.....	12
2.7. Importância da <i>Escherichia coli</i> na Saúde Pública e Veterinária.....	13
2.7.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	14
2.7.2. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	14
2.7.3. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC).....	14
2.7.4. <i>Escherichia coli</i> com aderência difusa (DAEC).....	15
2.7.5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	15
2.7.6. <i>Escherichia coli</i> Produtora de Toxina Shiga (STEC).....	15
2.8. Uso de Ferramentas Moleculares no Estudo de <i>Escherichia coli</i> .....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. Seleção dos Municípios.....	19
3.2. Município de Barra Mansa.....	19
3.3. Município de Resende.....	19
3.4. Seleção das Propriedades.....	21
3.5. Coleta das Moscas.....	21
3.6. Procedimento Laboratorial.....	21
3.7. Coleta do Leite.....	23
3.8. Isolamento Bacteriano.....	25
3.8.1. Moscas coletadas.....	25
3.8.2. Leite coletado.....	30
3.8.2.1. Avaliação do teste da sensibilidade antimicrobiana.....	30
3.8.3. Extração de DNA para a Amplificação Randômica de DNA Polimórfico	32

(RAPD).....	
3.8.4. Análise RAPD.....	32
3.8.5. Detecção dos genes de virulência <i>stx 1</i> , <i>stx2</i> e <i>eaeA</i> .....	33
3.9. Análise Estatística.....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
4.1. Propriedades utilizadas no estudo.....	35
4.1.1. Caracterização das propriedades rurais visitadas .....	35
4.2. Avaliação da Mastite Bovina e Sensibilidade Antimicrobiana nas Propriedades Visitadas .....	40
4.3. Avaliação da Microbiota Enterobacteriana em <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	49
4.3.1. Microbiota enterobacteriana em <i>Stomoxys calcitrans</i> no município de Resende.....	54
4.3.2. Microbiota enterobacteriana em <i>Stomoxys calcitrans</i> no município de Barra Mansa.....	55
4.4. Observações da Microbiota Enterobacteriana Identificada.....	55
4.5. Associação das Enterobactérias Identificadas nas Moscas Coletadas e no Leite com Mastite.....	60
4.6. Avaliação da Variabilidade Genética das Amostras de <i>Escherichia coli</i> Isoladas.....	61
4.7. Incidência de <i>Escherichia coli</i> Shiga-Toxigênica (STEC) em <i>Stomoxys calcitrans</i> e leite com mastite.....	71
4.8. Considerações Finais.....	74
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a Idade Antiga, as moscas são descritas em citações, como perturbadoras e propagadoras de doenças pelo fato de viverem sempre associadas ao homem e animais e principalmente aos seus dejetos, excrementos, secreções e materiais orgânicos em decomposição, ou seja, substratos com grande potencial de albergar agentes patogênicos.

Muitos pesquisadores já vêm estudando o impacto e a capacidade dos dípteros muscídeos na veiculação e até mesmo na transmissão de patógenos, sejam eles bactérias, fungos, vírus, protozoários, ovos e larvas infectantes de helmintos.

Em decorrência destes fatores, que implicam na possibilidade de transmissão de agentes patogênicos pelas moscas, Greenberg concentrou em dois livros, publicados nos anos de 1971 e 1973, um grande número de trabalhos nos quais foram estudadas e avaliadas a veiculação e transmissão de microrganismos por dípteros muscóides, principalmente as moscas sinantrópicas, ou seja, moscas que têm um ciclo de vida próximo ao homem.

Dentre as moscas sinantrópicas de distribuição cosmopolita, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758), que também é conhecida como mosca dos estábulos, parasita bovinos, eqüinos, caprinos, ovinos, cães e até mesmo o homem. Sua importância está relacionada ao hematofagismo e pelos danos causados aos animais parasitados, que se traduzem em prejuízos econômicos.

Os animais parasitados pela mosca dos estábulos, destacando-se os bovinos, tendem ao emagrecimento e, conseqüentemente, à diminuição da imunidade inata, proporcionando assim uma maior exposição à ação de agentes patogênicos.

A mastite bacteriana bovina recebe destaque em estudos relacionados com os agentes transmitidos por *S. calcitrans*, visto que a freqüência desta enfermidade é maior quando há um aumento populacional desta mosca (STORK, 1979). As enterobactérias recebem grande destaque na literatura, devido a sua capacidade de produzir doenças em humanos e em animais, principalmente em locais com baixo nível de higiene e saneamento.

Com base nestas observações, levantou-se a hipótese de que a mosca dos estábulos seria capaz de albergar enterobactérias em todos os seus segmentos, bem como possuir a capacidade de carrear agentes enterobacterianos causadores de mastite bovina, em especial, amostras de *Escherichia coli*.

Este estudo teve como objetivo determinar a prevalência de enterobactérias isoladas de segmentos distintos de *S. calcitrans* (superfície externa, aparelho bucal e trato digestório abdominal) e da microbiota do leite coletado de vacas positivas frente ao teste “California Mastitis Test” (CMT), a sensibilidade antimicrobiana destes agentes, assim como investigar características bio-genético-epidemiológicas relacionadas à diversidade e virulência em amostras de *E.coli* isoladas de fontes diversas.

Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir para ampliar o conhecimento do papel da mosca dos estábulos na veiculação e transmissão de agentes bacterianos com potencial patogênico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Transmissão de Microrganismos por Dípteros Muscóides

As moscas sinantrópicas das famílias Sarcophagidae, Calliphoridae e principalmente da família Muscidae são consideradas como potenciais veiculadoras de patógenos (OLSEN, 1998). O tropismo destas moscas por fezes, lixo e matéria orgânica em decomposição, para alimentação e reprodução faz com que elas se tornem vetores de diversos agentes patogênicos (GRACZYK et al., 2001).

Greenberg, em 1971 e 1973, realizou um amplo levantamento bibliográfico, onde listou diversas espécies de moscas e os agentes nelas isolados e seu potencial biótico como transmissor ou simplesmente veiculador de agentes.

Dentre as moscas, a família Muscidae foi a mais estudada por diversos autores, destas, a espécie *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) foi a mais estudada em decorrência de seu maior sinantropismo e, na maioria das vezes, maior população nos mais variados ambientes. Além deste fator, sua ecologia e biologia fazem com que ela se torne vetor mecânico de diversos patógenos humanos e animais (HEDGES, 1990).

As moscas sinantrópicas são responsáveis pela disseminação de enfermidades, principalmente nos países em desenvolvimento e na transmissão de infecções nosocomiais em ambientes hospitalares (GRACZYK et al., 2001).

Estruturalmente, as moscas são adaptadas para a veiculação de agentes patogênicos. As probóscides são providas de uma grande quantidade de cerdas que prontamente coletam os detritos ambientais. Além disso, apresentam cerdas nas patas e nas extremidades das patas é produzida uma secreção viscosa, que facilita aderência de agentes microbianos (NAZNI et al., 2005).

Nazni et al. (2005) também comentam que as moscas podem ingerir alimentos líquidos e que geralmente regurgitam o material ingerido para liquefazer materiais sólidos a fim de facilitar a digestão. Além disso, tendem a defecar durante a sua alimentação, o que aumenta seu potencial de transmissão de agentes patogênicos.

Esten e Mason (1908) descreveram que cada mosca pode albergar até  $6 \times 10^6$  bactérias. Posteriormente, Richard (1961) verificou que algumas espécies de bactérias persistem viáveis por longo tempo nessas moscas.

Dentre as espécies desta família, *Stomoxys calcitrans* apresenta importância médica e principalmente veterinária, devido ao íntimo contato que mantêm com os animais e em consequência do hematofagismo, representa uma real ameaça à saúde de seus hospedeiros. Ao realizar o repasto sanguíneo, esta mosca pode carrear diversos agentes patogênicos e disseminá-los para outros indivíduos do rebanho (SCHOFIELD; TORR, 2002).

### 2.2 Transmissão de Agentes Patogênicos por *Stomoxys calcitrans*

A mosca dos estábulos, segundo diversos autores, é responsável pela veiculação e transmissão de diversos agentes causadores de enfermidades ao homem e animais. De acordo com Greenberg (1971), foi relatada a presença de nove diferentes espécies de vírus, 47 de bactérias, 23 de protozoários e oito de helmintos, sejam esses microrganismos observados como transmitidos ou carreados pela referida mosca.

No que se refere à transmissão e/ou transporte de microrganismos por *S. calcitrans*, desde o início do século XX diversos autores realizaram estudos acerca deste assunto. O estudo mais antigo com relato na literatura foi o de Hecker (1899), onde no final do século IX

constatou que as moscas tinham sua superfície externa contaminada pelo vírus da Febre Aftosa quando a mesma se alimentava em animais enfermos.

Em 1912, alguns autores descreveram a capacidade de veiculação do vírus da poliomielite pela mosca dos estábulos e, segundo os mesmos, esta mosca também teria a capacidade de transmissão do referido vírus (ROSENAU; BRUES, 1912; ANDERSON; FROST, 1912).

No mesmo ano, Mitzmain obteve sucesso na transmissão de *Trypanosoma evansi* por *S. calcitrans*. Posteriormente, o estudo foi refeito por outros autores, que concordaram com os dados relatados por Mitzmain (DIEBEN, 1928; MIHOK et al., 1995; LEUNITA-SUMBA et al., 1998).

Scott (1915) em seu estudo com o vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIE) verificou que a mosca dos estábulos teria a capacidade de transmissão deste agente. Fato concluído posteriormente em outros estudos, como os realizados por Stein et al. (1942), Cupp e Kemen (1980) e Foil et al. (1983).

Berberian (1938) relatou que a mosca dos estábulos nos EUA foi capaz de transmitir a leishmaniose cutânea do velho mundo (*Leishmania tropica*). Greenberg (1973) confirmou o observado no experimento anterior, obtendo novamente sucesso na transmissão do agente pelo mesmo muscídeo em três tentativas. Este estudo foi corroborado posteriormente por Laison e Southgate (1965).

Em 1950, Blanc et al. estudaram a transmissão de *Toxoplasma gondii* por *S. calcitrans*. Os autores relataram que houve a morte de ratos inoculados com macerados destas moscas. Posteriormente Laarman (1956) observou formas de *T. gondii* no tubo digestório da mosca dos estábulos em até 22 horas após alimentação em animal positivo.

Em 1971, Greenberg observou que esta mosca foi descrita veiculando oito espécies de helmintos, porém outra espécie da família Muscidae, *Musca domestica*, tem sido a espécie com maior número de citações na literatura científica, relatando 39 diferentes espécies de ovos de helmintos. Outros estudos indicaram a presença de ovos de helmintos na superfície externa, como também no tubo digestório de outras moscas dissecadas, tais como *Ancylostoma duodenale*, *Vampirolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Taeniarhynchus saginatus*, *Schistosoma mansoni*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma caninum*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* (SCHIRCORE, 1916 apud GREEBERG, 1973; HARADA, 1954; GUPTA, 1972; LAWSON; GEMMEL, 1983; JOURDAN et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2002).

Potgieter et al. (1981) avaliaram a possibilidade de *Hippobosca rufipes* e de *S. calcitrans* de transmitir *Anaplasma marginale* na África do Sul. Nesse estudo, os autores relataram que não conseguiram transmitir a rickétsia por *H. rufipes*. Enquanto que, foi obtido sucesso na transmissão pela mosca dos estábulos, com período pré-patente de 27 dias.

Lawson e Gemmel (1983) citam Nadzhafov (1967) quanto à capacidade de *S. calcitrans* carrear *Taeniarhynchus saginata*. Estes autores observaram que a mosca dos estábulos conseguia carrear ovos deste helminto aderidos a sua superfície externa. A mosca *S. calcitrans* também é citada como hospedeiro intermediário de *Habronema*, onde larvas de primeiro estágio (L1) são ingeridas por formas larvares da mosca, desenvolvendo-se até larvas infectantes de último estágio (L3), saindo de suas probóscidas quando os adultos pousam no hospedeiro definitivo (SOULSBY, 1982; URQUHART et al., 1998; MARCONDES, 2001).

Em outro estudo sobre a transmissão de patógenos virais por dípteros muscídeos, Tarry et al. (1991) tentaram isolar o agente da diarreia viral bovina de três muscídeos (*S. calcitrans*, *Haematopota pluvialis* e *Hydrotaea irritans*). De acordo com os resultados obtidos, todas as espécies de moscas estudadas foram capazes de se contaminar com o agente patogênico, indicando que os mesmos têm potencial de transmitir o vírus mecanicamente.

Outra rickétsia com capacidade de ser veiculada pela *S. calcitrans* é *Ehrlichia risticii*, agente da febre do Rio Potomac em equinos. Estudada por Burg et al. em 1994, nos EUA, a mosca dos estábulos teria a capacidade de carrear formas viáveis de *E. risticii* por no máximo três horas.

### 2.3 Transmissão de agentes bacterianos

Greenberg (1971) reportou a existência de 38 espécies diferentes de bactérias na mosca dos estábulos; um número relativamente pequeno, comparando-se com os estudos na mosca doméstica, onde foram verificadas cerca de 200 espécies e subespécies distintas de bactérias; isto se explica pela maior população e sinantropismo de *M. domestica* em relação a *S. calcitrans*. Enquanto que Harwood e James (1979) descreveram mais de 100 espécies bacterianas em um estudo com *M. domestica*.

Em um estudo mais recente, Castro (2004) avaliou a microbiota bacteriana em três segmentos da mosca dos estábulos em alguns municípios do estado do Rio de Janeiro. Dentre a microbiota isolada e identificada, foi verificado que 18 espécies bacterianas foram isoladas em exemplares de *S. calcitrans* pela primeira vez, fato que demonstra a importância desses estudos sobre este muscídeo no país.

Outro muscídeo de grande importância para a pecuária nacional é a *Haematobia irritans*, também conhecida como mosca dos chifres. Esta mosca também foi pouco estudada quanto à transmissão de agentes bacterianos como descrito por Greenberg (1971). Segundo o autor, foram observadas 16 espécies bacterianas nesta mosca, sendo principalmente estudadas as enterobactérias. A mosca dos chifres, assim como a mosca dos estábulos, tem um importante papel no que se refere à transmissão de patógenos devido ao hematofagismo.

Os estudos sobre a veiculação bacteriana por parte destes muscídeos se referem principalmente à transmissão de agentes enteropatogênicos e também sobre a microbiota causadora de patologias em homens e animais, como a mastite bacteriana bovina, que gera um grande prejuízo a economia nacional e que está intimamente relacionada com a diarreia humana (BÉJAR et al., 2006).

Ao estudar a presença de bactérias associadas à mosca dos estábulos, Bramley et al. (1985) conseguiram isolar *Staphylococcus aureus*, confirmado experimentalmente por Madsen et al. (1991) que avaliaram a capacidade de transmissão de bactérias por moscas infectadas artificialmente.

Na tentativa de isolar *Corynebacterium pseudotuberculosis* de *S. calcitrans*, Braverman et al. (1999) afirmaram que a mesma não era importante no transporte e na transmissão desta bactéria. Por outro lado, alguns autores isolaram esta bactéria em *M. domestica* e *Haematobia irritans* (YERUMAN et al., 1996; OWENS et al., 1998; BRAVERMAN et al., 1999 e EDWARDS et al., 2000)

Outro ponto de estudo, como anteriormente citado, é a transmissão de agentes enteropatogênicos de diferentes famílias, dentre elas as famílias Enterobacteriaceae e Micrococcaceae. Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram negativas muito ampla, que inclui uma grande variedade de bactérias patogênicas. Algumas espécies desta família, tal como *E. coli*, fazem parte da microbiota normal do intestino de seres humanos e animais. Outras espécies habitam o solo ou a água e estão implicados em processos patogênicos, incluindo, por exemplo, os gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (KONEMAN et al., 2001).

As espécies da família Enterobacteriaceae são as maiores causadoras da diarreia humana e animal (BROOKS et al., 2000). Em relação a esta família, Greenberg (1971) relata a existência de 14 diferentes espécies e subespécies bacterianas presentes na mosca dos

estábulo, sendo elas, *E. coli*, *E. coli communior*, *E. coli colicommunis*, *E. coli neapolitana*, *E. freundii*, *E. intermedia*, *Aerobacter aerogenes*, *Aerobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella blockley*, *S. paratyphi*, *S. typhi* e *Shigella dysenteriae*.

Quanto às enfermidades causadas por enterobactérias, as gastroenterites agudas com diarreia severa, causadas por *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e diversas categorias e/ou grupos e/ou classes de *E. coli*, são observadas predominantemente em países em desenvolvimento, onde se verifica uma alta taxa de morbidade e mortalidade entre humanos. A ocorrência de enfermidades diarreicas está relacionada a altas temperaturas, que favorecem o aumento tanto das populações bacterianas como também no número de moscas (GRACZYK et al., 2001). De acordo com Khalil et al. (1994), nas áreas rurais dos países onde as moscas estão presentes em grande número e as condições de higiene são precárias, existe uma influência significativa na incidência das enfermidades gastroentéricas. Neste estudo foi observado que o controle populacional das moscas sinantrópicas coincidiu com uma redução na casuística destas enfermidades entre neonatos e crianças.

*E. coli* é uma das espécies desta família mais estudada devido a seu alto potencial patogênico. Diversos estudos visavam avaliar o papel de dípteros muscídeos na veiculação e transmissão deste agente a alimentos de consumo humano e animal. Diversos autores detectaram *E. coli* produtoras de toxina Shiga na mosca doméstica (IWASA et al., 1999; KOBAYASHI et al., 1999; SASAKI et al., 2000). Em seu estudo, Buma (1999) avaliou a presença de bactérias patogênicas em moscas coletadas em propriedades rurais e observou a presença de desta linhagem de *E. coli* em moscas dos estábulos. Em estudo semelhante realizado no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Castro et al. (2001) avaliaram a similaridade da microbiota de leite com mastite e de espécimes de *S. calcitrans* coletadas das vacas enfermas, e observaram a presença de *E. coli*, dentre as espécies isoladas no macerado destas moscas.

Em relação a outras enterobactérias, Hamilton et al. (2003), em estudo no Reino Unido, isolaram do tubo digestório de larvas da mosca dos estábulos *Enterobacter sakazakii*, bactéria causadora de meningite, septicemia e enterocolite necrosante em humanos neonatos, principalmente os prematuros e os imunocomprometidos. Desta forma os autores sugeriram que as larvas da mosca dos estábulos serviriam de reservatório ambiental deste patógeno.

Como citado anteriormente, Castro (2004) observou agentes bacterianos isolados em indivíduos de *S. calcitrans*. Neste estudo espécies bacterianas de diversas famílias foram verificadas, com maior destaque para as famílias Bacillaceae, Micrococcaceae e Enterobacteriaceae. Dentre os agentes isolados do referido estudo, foram identificados agentes com grande capacidade patogênica além de agentes com nenhum potencial patogênico descrito pela literatura.

De acordo com Turell et al. (1987), nos EUA, a mosca dos estábulos, assim como os mosquitos *Aedes aegypti* e *A. taeniorhynchus* também foram capazes de transmitir experimentalmente *Bacillus anthracis*, causador do Anthrax, confirmando desta forma a capacidade destes dípteros em transmitir mecanicamente o referido patógeno, sendo necessária a proposição de medidas visando a diminuição da população destes vetores como parte integrante do programa de controle desta enfermidade.

Diversos autores afirmam que medidas de controle da população de moscas, além de outros vetores são fundamentais no controle e profilaxia de diversas enfermidades tais como a mastite, a diarreia humana e animal, além de outras enfermidades (THOMAS et al., 1985; HILLERTON et al., 1990; NICKERSON et al., 1995; BARNETT et al., 1999; BERRY; BOOTH, 1999; GRACZYK et al., 2001).

## 2.4 Associação da Mastite Bacteriana Bovina com Dípteros Muscídeos

Stork (1979) correlacionou o pico de aparecimento de moscas no verão com o aumento de casos de mastite em rebanhos leiteiros, que foi confirmado pelo isolamento de *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* nas moscas coletadas. O autor verificou também, que após a adoção de medidas para controlar *S. calcitrans*, os casos de mastite diminuíram.

Ao avaliarem a capacidade da transmissão de mastite por moscas, Yeruman et al. (1996) e Braverman et al. (1999) isolaram *Corynebacterium pseudotuberculosis* de *M. domestica* em seus experimentos. Da mesma forma, Owens et al. (1998) e Edwards et al. (2000) também isolaram outros agentes causadores desta enfermidade em *H. irritans*.

A mosca da cabeça da ovelha, *Hydrotaea irritans*, é o muscídeo com o maior número de citações na literatura no que tange a transmissão de bactérias responsáveis pela mastite bovina (CHIRICO et al., 1997; BRAMLEY, 1985; HILLERTON; BRAMLEY et al., 1985; THOMAS et al., 1985; SOL, 1990; HILLERTON et al., 1990). Segundo Bramley et al. (1985) e Tarry et al. (1988), a transmissão destes agentes patogênicos ocorre principalmente pelas fêmeas da mosca *H. irritans*, que possuem a capacidade de carrear microrganismos causadores de mastite. Segundo os mesmos autores, a transmissão ocorre por contato, já que a mesma não tem a capacidade de perfurar a pele dos bovinos.

Além dos prejuízos decorrentes da queda na produção leiteira, o leite com mastite deve ser descartado para o consumo humano, pois o mesmo pode conter microrganismos produtores de enterotoxinas, que podem causar intoxicação alimentar, levando a graves conseqüências à saúde humana (SMITH, 1994).

## 2.5 Mastite Bacteriana Bovina

A mastite bovina é uma doença de grande importância, sobre a qual muito se tem estudado. A maior parte dos casos de mastite se apresenta sem sinais físicos de processo inflamatório agudo, sendo crônicas ou incipientes e, apesar do aspecto inofensivo, causam sérios prejuízos econômicos. A mastite ocorre normalmente em resposta à infecção intramamária, principalmente bacteriana, podendo também ser causada por fungos, vírus ou algas. No entanto, a maioria das mastites é de origem bacteriana (RADOSTITS et al., 2002; DIAS, 2007).

A mastite bacteriana bovina possui etiologia diversa, e bactérias como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, se destacam como agentes desta enfermidade (MADSEN et al., 1991; LANGONI et al., 1998; FISHER, 1999; FONSECA; SANTOS, 2000).

A mastite bovina é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, sendo observada redução da quantidade produzida, alteração da qualidade do leite, podendo haver perda total da capacidade secretora do quarto mamário. Esta enfermidade é caracterizada por uma inflamação da glândula mamária e pode ser classificada como clínica ou subclínica. A mastite clínica apresenta sinais evidentes, tais como edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (FONSECA; SANTOS, 2000).

Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite. Portanto, não apresenta sinais visíveis de inflamação da glândula mamária (CULLOR et al., 1994). A mastite infecciosa subclínica é aquela que apresenta resultado positivo ao “California Mastitis Test” (CMT), ou outros testes indicativos, sendo confirmada pelo crescimento microbiano. A mastite subclínica pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite. Estas são compostas basicamente por dois tipos de células principais: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue, sendo que estas se apresentam com elevadas concentrações nos casos de mastite (DIAS, 2007).

No Brasil, segundo Brant e Figueiredo (1994), a mastite subclínica caracteriza-se pela alta incidência, com índices variando de 44,88% a 97,0%, e a redução da produção de leite situa-se entre 25,4% e 43,0%. Machado (2003) relatou que a prevalência de mastite subclínica nos rebanhos era de aproximadamente 40% e que as taxas de novas infecções e infecções crônicas eram de 22% e 68%, respectivamente. Estes números mostram que os animais ficam infectados facilmente e que na sua grande maioria permanecem infectados, resultando em uma alta prevalência da doença.

O CMT é um dos testes mais usuais para o diagnóstico da mastite subclínica, sendo um indicador indireto da contagem de células somáticas no leite. Este teste consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, um detergente aniônico neutro é adicionado, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucléico (DNA), que irá apresentar determinada viscosidade. De acordo com a intensidade da reação, o resultado do teste é classificado como negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (FONSECA; SANTOS, 2000).

A identificação dos microrganismos causadores da infecção da glândula mamária é de grande importância tanto para o controle e prevenção, quanto, também, para o monitoramento de rebanhos. Para isso, o diagnóstico bacteriológico é decisivo, porém caro e mais demorado, sendo pouco aplicável a rebanhos com grande número de animais (Brito et al., 1999).

Segundo Brito et al. (1999), o exame microbiológico é considerado o método padrão para o diagnóstico da mastite bovina, sendo que o seu principal objetivo é oferecer resultados seguros ao veterinário, para que ele possa identificar e tratar a enfermidade. Os antibióticos mais utilizados para o tratamento da mastite bovina têm sido a penicilinas, cefalosporinas e tetraciclina (Zwald et al., 2004). Deste modo, medidas específicas de controle direcionadas para o ambiente, ou para a higiene da ordenha, podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado.

Em seu estudo, Langenegger et al. (1981) concluíram que os quartos mamários com mastite subclínica diagnosticada pelo CMT, produziam 25,4% menos leite do que os quartos normais. A reação positiva ao CMT foi relacionada com o exame bacteriológico, onde foi constatado que a intensidade com que a mastite subclínica afeta a produção de leite, em quantidade e qualidade, variou de acordo com a natureza dos agentes etiológicos envolvidos, com duração das infecções e propagação da infecção no rebanho.

### **2.5.1 Importância da mastite no Brasil**

A produção do leite do Brasil segue em crescente expansão ao longo dos anos. Segundo o IBGE, em 2005, o país produziu 25 bilhões de litros de leite, classificando o Brasil como o sexto maior produtor de leite do mundo. No Brasil, a pecuária leiteira, devido a sua enorme importância social, é uma das atividades mais significativas ligadas ao agro-negócio do país, visto que é praticada em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera mais de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões de reais ao valor da produção agropecuária nacional (FAGUNDES, 2007).

Nesse contexto, a qualidade da matéria prima tornou-se um dos maiores requisitos para o desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios do Brasil. De acordo com Fagundes (2007), o controle da qualidade do leite nas últimas décadas havia sido restrito a prevenção de adulterações do produto *in natura* como, por exemplo, a determinação da acidez, índice crioscópico e da densidade do produto. A contagem global de microrganismos aeróbios mesófilos e a contagem de células somáticas, que indica a higiene do processo de obtenção do leite e a presença de mastite nos animais, respectivamente, só foi exigido após a implementação da Instrução Normativa 51 em 2002 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esta norma é constituída pelos regulamentos técnicos sobre a produção, intensidade e qualidade dos diversos tipos de leite no país, bem como a coleta e o transporte a granel do leite cru refrigerado.

O número de doenças associadas ao consumo de leite não tratado termicamente e o risco de transmissão de agentes patogênicos e seus metabólitos são fatores bastante importantes de vigilância pública de saúde, tendo em vista que 40% da comercialização do leite no país é de origem informal (FARIA, 1998).

O número crescente e a gravidade das doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo têm aumentado consideravelmente o interesse público em relação à segurança alimentar. Assim, considerando o leite como alimento básico na dieta humana, principalmente para crianças e idosos, sua qualidade torna-se muito importante (FAGUNDES, 2007).

Além do problema em saúde pública, a mastite é considerada a enfermidade que proporciona as maiores perdas econômicas na produção bovina. Estima-se que haja um prejuízo de cerca de US\$ 1,8 bilhões por ano nos EUA, em função da ocorrência da mastite no rebanho norte americano (National Mastitis Concil, 1996). No Brasil, estima-se que em função da alta prevalência da mastite nos rebanhos, possa ocorrer uma perda de produção entre 12 e 15%, o que significaria um total de 3,64 bilhões de litros por ano em relação à produção anual média de 20 bilhões de litros (FONSECA; SANTOS, 2000).

## **2.6 Associação de *Escherichia coli* e Mastite Bacteriana Bovina**

Um dos mais prevalentes microrganismos de origem ambiental da mastite bovina é *E. coli*. As infecções mamárias determinadas por esta bactéria ocorrem sob a forma clínica, de maneira hiperaguda ou aguda, nas primeiras semanas pós-parto, caracterizada pela difícil resolução terapêutica, nos casos com comprometimento sistêmico, e morte ocasional de animais por toxemia (JONES, 1990; RADOSTITS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2006). O microrganismo também tem sido investigado em casos de mastite subclínica bovina (DÖPFER et al., 1999; RIBEIRO, 2001).

Mastite causada por *E. coli* acarreta em consideráveis perdas econômicas na produção leiteira, como indicado pela baixa produção, baixa qualidade do produto, alto custo com tratamento dos animais e, ocasionalmente, perda do teto e até mesmo morte ou descarte do animal (SANCHEZ-CARLO et al., 1984; WENZ et al., 2006). A razão da importância de mastite bovina por *E. coli* está no aumento da incidência e nos danos causados ao animal (FANG; PYORALA, 1996).

Estudos epidemiológicos relacionam os casos de doença humana por linhagens de *E. coli* com o consumo de leite bovino e derivados submetidos ou não à pasteurização (RIBEIRO et al., 2006). Em São Paulo, Fagundes (2007) observou a presença deste agente em amostras de leite. Apesar de ser um agente com grande potencial patogênico, no Brasil são limitados os estudos sobre fatores de virulência especialmente aqueles destinados que abordam aspectos da diversidade genética em estirpes de *E. coli* isoladas de mastite bovina (LIRA et al., 2004).

## **2.7 Importância de *Escherichia coli* na Saúde Pública e Veterinária**

A bactéria *E. coli* é o bacilo gram negativo anaeróbio facultativo predominante da microbiota intestinal dos humanos e dos animais, possuindo linhagens não patogênicas, enquanto que determinadas estirpes são reconhecidamente patogênicas e podem provocar várias doenças nos humanos e animais, como a diarreia, meningite, septicemia e infecções do trato urinário (NATARO; KAPER, 1998).

As estirpes de *E. coli* capazes de provocar doença são classificadas como patógenos intestinais e extraintestinais, segundo o local de isolamento (ORSKOV; ORSKOV, 1985; LIOR, 1994; KAPER et al. 2004).

As bactérias que causam infecções em sítios extra-intestinais (ExPEC) podem ser classificadas como: MENECA - *E. coli* que causam meningite neonatal; UPEC - *E. coli* uropatogênica, agentes de infecções do trato urinário de humanos e dos cães e SEPEC - *E. coli* septicêmica, agente de sepsis em humanos, leitões e bezerros (FARAH, 2005).

Estirpes de *E. coli* causadoras da síndrome diarreica são classificadas em seis categorias, de acordo com as propriedades de virulência como a produção de toxina, capacidade de invasão e a adesão às células do hospedeiro (KAPER, et al. 2004):

### **2.7.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é um importante agente etiológico da diarreia infantil de muitos países em desenvolvimento acometendo, principalmente, crianças menores de seis meses de idade. EPEC está associada com a expressão de um padrão de aderência localizada (LA) e com a formação de uma lesão histopatológica (lesão “attaching and effacing” A/E) caracterizada pela destruição das microvilosidades, formação de uma estrutura em forma de pedestal e concentração de proteínas do cito esqueleto, principalmente, de actina. Genes cromossômicos e plasmidiais estão envolvidos na expressão destes fenótipos e sua detecção é empregada na caracterização destes microrganismos. (McDANIEL et al. 1995; KAPER et al. 2004).

### **2.7.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) está associada com a doença diarreica de crianças em países em desenvolvimento e é um dos agentes etiológicos mais comuns na diarreia entre adultos provenientes de regiões desenvolvidas, caracterizando a diarreia dos viajantes. Os fatores de virulência de ETEC estão associados com a expressão de adesinas específicas e com produção de enterotoxinas termo-lábeis e/ou termo-estáveis codificadas por genes plasmidiais e cromossômicos (FARAH, 2005).

### **2.7.3 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)**

A *E. coli* enteroinvasora (EIEC) é agente de diarreia aquosa, distinta da induzida por ETEC e que pode preceder a um quadro disentérico. Amostras de *E. coli* enteroinvasora invadem as células epiteliais do cólon e em seguida provocam a lise do vacúolo endocítico. Os genes requeridos nesse processo estão localizados em um plasmídeo de virulência (SABRÁ, 2002).

#### **2.7.4 *Escherichia coli* com aderência difusa (DAEC)**

A *E. coli* que adere difusamente (DAEC) tem um papel bastante controverso na etiologia da síndrome diarréica. Esta categoria é caracterizada pela expressão da aderência difusa, na qual são observadas bactérias cobrindo uniformemente toda a superfície da célula epitelial em cultura. (YANO et al., 1996).

#### **2.7.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

A *E. coli* enteroagregativa (EAEC) tem como característica principal expressar o padrão de aderência agregativa onde é observada a formação de agregados bacterianos nas superfícies epiteliais assim como na lamínula de suporte, em regiões livres de células, formando um arranjo semelhante a tijolos empilhados. O crescente envolvimento da EAEC com a doença diarréica, especialmente, em países em desenvolvimento e comumente associada a um quadro persistente, tem possibilitado o seu reconhecimento como um enteropatógeno emergente. Os mecanismos de virulência estão sendo investigados e diversas toxinas e adesinas têm sido descritas (BUERIS et al., 2007).

#### **2.7.6 *Escherichia coli* produtora da Toxina de Shiga (“Shiga-like toxin”)**

A *E. coli* Shiga-Toxigênica (STEC), também denominada *E. coli* Vero-Toxigênica, é caracterizada pela produção de um ou mais tipos de citotoxinas que podem causar destruição tissular em humanos e animais (PATON; PATON, 1998; VERWEYEN et al., 2000). Humanos infectados com STEC apresentam sintomas como dor abdominal, diarréia aquosa, e inúmeros pacientes desenvolvem doenças para toda a vida como colite hemorrágica (HC) e síndrome urêmica hemolítica (HUS) (VERWEYEN et al., 2000).

As STEC são encontradas no intestino de animais sadios, sendo o principal reservatório o gado bovino, e também no meio ambiente onde os animais são mantidos (FENG, 1995). Nos bovinos, os receptores Gb3 estão presentes apenas no cérebro e no rim, e a falta destes receptores no intestino explicaria a ausência da doença intestinal nestes animais (PRUIMBOOM-BREES et al. 2000).

A excreção de STEC nos bovinos parece estar relacionada à alimentação do animal. A influência da dieta está baseada na habilidade de *E. coli* em desenvolver resistência ao pH ácido, aumentando o risco de doenças de origem alimentar no homem. O uso de ração rica em grãos na alimentação do gado é responsável por baixar o pH do cólon devido aos ácidos produzidos na fermentação. Nesses animais as STEC acabam adquirindo resistência aos ácidos além de serem encontradas em maior quantidade (DIEZ-GONZALEZ et al., 1998).

A acidez estomacal é considerada uma barreira à infecção pelos enteropatógenos, mas devido à adaptação ocorrida no rúmen do bovino, as STEC tornaram-se capazes de resistir a este mecanismo de defesa (CRAY et al., 1995). A resistência ao pH ácido do estômago também é uma característica importante para a virulência das STEC, pois permite que estes organismos sejam capazes de desencadear doença mesmo quando presentes em baixo número no alimento contaminado (PATON; PATON, 1998).

Embora o bovino seja considerado o principal reservatório da doença provocada por STEC, estirpes de STEC têm sido isoladas de vários animais domésticos e selvagens (HANCOCK et al., 1998).

De acordo com Paton e Paton (1998), o consumo de carne e leite cru foi confirmado como sendo uma das fontes mais importantes de infecção em surtos que ocorreram durante a última década, principalmente no Canadá, Estados Unidos da América, Reino Unido e Japão.

A associação com alimentos industrializados sugere que os avanços tecnológicos na indústria de processamento de alimentos eventualmente acabam contribuindo para a disseminação da doença, como ocorre na produção em massa de hambúrgueres, sucos, e outros alimentos, onde pequenas quantidades de alimentos contendo STEC acabam contaminando porções maiores do produto final (BERKELMAN, 1997).

STEC altamente virulentas para o homem, capazes de causar HC e HUS também são denominadas *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC), e amostras típicas desta linhagem possuem virulência especial que são aqueles que carregam o “locus of enterocyte effacement” (LEE). Um dos genes localizados no LEE é o *eae* (“*E. coli* attaching and effacing”), que codifica a intimina, uma membrana protéica externa envolvida na aderência da bactéria nas células intestinais do hospedeiro (BEUTIN et al., 2007). O fator que pode também afetar a virulência das STEC é a enterohemolisina (*hly*), também denominada EHEC-hemolisina (EHEC-HlyA), que é codificado pelo gene *hly* (SCHMIDT et al., 1995).

Para STEC, os dois principais tipos de toxina Shiga são denominados Stx1 e Stx2, onde variantes genéticas destas toxinas já vêm sendo descritas pela literatura (BEUTIN et al., 2007). No que se refere à toxicidade das toxinas Shiga, Aktories e Just (2000) relatam que a toxina Stx2 e suas variantes são mais tóxicas que as toxinas da família Stx1, provavelmente pela melhor capacidade da Stx2 ser transportada dentro das células e sistemicamente.

Informações sobre a ocorrência e os aspectos genético-epidemiológicos destes microrganismos em nosso meio, ainda são bastante limitadas. No Brasil, os estudos sobre STEC ainda são incipientes. Cepas produtoras de toxina Shiga, codificada pelo gene *stx* foram isoladas de rebanho bovino aparentemente saudável (CERQUEIRA et al. 1999; SILVA, 2002), com alta prevalência desta linhagem e aparentemente há predomínio de STEC não O157 (CERQUEIRA et al. 1999; IRINO et al. 2005; PIGATTO, 2004). Ainda não houve relatos de surtos associados com STEC no país e as estirpes isoladas de infecções em humanos têm sido relatadas de casos esporádicos de diarreia e raros casos de diarreia hemorrágica e de HUS (IRINO et al. 2002; GUTH et al., 2002a, 2002b, 2005; VAZ et al., 2004; DE TONI, 2004).

## **2.8 Uso de Ferramentas Moleculares no Estudo de *Escherichia coli***

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e o uso extensivo de sistemas de diagnóstico e de tipagem, baseados na análise direta ou indireta do polimorfismo genômico, tem possibilitado elucidar mecanismos de virulência bem como estudar a diversidade e a estrutura genética de populações de *E. coli*, contribuindo com informações sobre os seus aspectos biológicos e epidemiológicos (GÜRTLER; MAYALL, 2001; REGUA-MANGIA et al., 2004; REGUA-MANGIA et al., *in press*).

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, não se fazendo necessário o conhecimento prévio de seqüência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos EUA. Williams et al. (1990) patentaram a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), DNA polimórfico amplificado ao acaso. Welsh e McClelland (1990) propuseram a denominação AP-PCR (“Arbitrary Primed – Polymerase Chain Reaction”) uma vez que os iniciadores possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos do genoma. O experimento deste grupo foi essencialmente a geração de impressões digitais genômicos simples e reproduzíveis para identificação de linhagens.

As técnicas moleculares baseadas na amplificação de seqüências genéticas específicas têm sido instrumentos importantes para a detecção de uma grande variedade de

microrganismos, incluindo subpopulações de *E. coli* (YAMAMOTO et al., 1995; PERSSON et al., 2007). Além de fornecerem resultados rápidos, estas metodologias têm se mostrado altamente sensíveis e específicas atendendo também aos critérios elaborados para a avaliação de sistemas de tipagem como a estabilidade e a reprodutibilidade.

Para a tipagem genética de patógenos bacterianos, a amplificação randômica do DNA polimórfico, conhecida pela sigla RAPD-PCR (“Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction”) tem sido utilizada como um importante instrumento de investigação da variabilidade genética (BELKUM et al., 2001). O RAPD-PCR, em condições experimentais padronizadas, é rápido, sensível, flexível, tecnicamente simples, com reduzido custo operacional e apresenta boa correlação com sistemas de tipagem de referência internacional, como a eletroforese em campo pulsado (REGUA-MANGIA et al, 2004). Esta técnica consiste da utilização de um iniciador arbitrário em uma reação da polimerase em cadeia que ocorre em condições de baixa restringência.

Outros métodos moleculares também têm sido utilizados como sistemas de tipagens moleculares como “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (PFGE) e “Multilocus Enzyme Electrophoresis” (MLEE). Porém estes métodos têm sido relatados como muito laboriosos, demorados e relativamente caros (PACHECO et al., 1997; REGUA-MANGIA et al, 2004)

Particularmente para populações de *E. coli*, o RAPD-PCR tem se tornado um método alternativo de tipagem com elevado potencial discriminatório, possibilitando detectar a diversidade genética e a ocorrência de padrões eletroforéticos grupo-específicos entre amostras epidemiologicamente relacionadas (PACHECO et al., 1997; ASAKURA et al., 2001; KIM et al., 2005; REGUA-MANGIA et al., 2004).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Seleção dos Municípios

Foram visitados os municípios de Barra Mansa e Resende, durante os meses de novembro de 2005 a março de 2007 (Figura 1). Estes municípios foram selecionados em decorrência da presença da mosca *S. calcitrans* em propriedades leiteiras nestas localidades que se situam na Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se localiza a maior bacia leiteira do Estado do Rio de Janeiro, no que se refere à produtividade leiteira (IBGE, 2006). Nestes municípios também foi verificada em estudos anteriores, similaridade entre os isolados bacterianos da microbiota do macerado de moscas e do leite positivo para mastite sem, no entanto, ter sido confirmado geneticamente que se tratava da mesma bactéria (CASTRO et al., 2001; MORAES et al., 2004).

#### 3.1.1 Município de Barra Mansa

O Município de Barra Mansa possui uma área territorial de 548 km<sup>2</sup>, tendo o Distrito Sede uma latitude de 22,54417° Sul e longitude 44,17139° Oeste, contando com 175.315 habitantes distribuídos pela área urbana e rural. A altitude de Distrito Sede é de 382 metros acima do nível do mar (IBGE, 2007).

Segundo dados do IBGE (2005), Barra Mansa contava com um rebanho de 28.500 bovinos e 1.515 eqüídeos. Dentre estes bovinos, 6.800 eram de vacas ordenhadas, com produção anual total de 24.000.000 litros de leite.

#### 3.1.2 Município de Resende

No município de Resende, o Distrito Sede (latitude de 22,46° Sul e longitude 44,45° Oeste) está a 407 metros acima do nível do mar. A população municipal é de 118.547 habitantes (IBGE, 2007).

De acordo com a Pesquisa Pecuária Municipal do IBGE (2005), o município em questão possuía um rebanho de 32.000 bovinos, sendo destes 7.800 vacas ordenhadas que produziram um total de 20.204.000 litros de leite no respectivo ano, ou seja, o maior município da referida microrregião em produção leiteira; contanto também com 2.950 eqüídeos.

### 3.4. Seleção das Propriedades

Foram selecionadas cinco propriedades rurais produtoras de leite por município, onde havia presença de moscas dos estábulos. A posição geográfica (latitude-S e longitude-W) de cada ponto de coleta foi obtida através de coordenadas planas, pelo sistema UTM (Universal Transverse Mercator), com auxílio de um aparelho GPS (Global Position System) (Garmin - Etrex Vista®, EUA).



### 3.5. Coleta das Moscas

Foram coletadas 20 moscas por propriedade, utilizando-se puçá entomológico, dando-se preferência por aquelas que estavam alimentando-se ou voando a uma distância máxima de meio metro dos animais (BRAMLEY et al., 1985). Cada mosca coletada foi acondicionada em um tubo de ensaio estéril, mantidas sob refrigeração e em seguida encaminhadas ao laboratório.

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em capela de exaustão e próximo ao bico de Bunsen (Figura 2). No laboratório, as moscas foram identificadas de acordo com Furman e Catts (1982), onde somente espécimes de *S. calcitrans* foram mortos por congelamento a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Dentre as 20 moscas coletadas e armazenadas individualmente, cada tubo contendo uma mosca representou um exemplar. A partir desta etapa, cada mosca foi então colocada em tubo de ensaio contendo caldo enriquecido Infuso de Cérebro Coração (BHI). Em seguida, as moscas foram agitadas neste caldo, de onde foram transferidas para outro tubo de ensaio com álcool 70% por 2 minutos, para esterilização de sua superfície externa, como descrito por Hillerton e Bramley (1985) e Castro (2004).

Após o procedimento supracitado, e sob a luz de um microscópio estereoscópio, cada mosca foi retirada do tubo com caldo BHI e colocada em uma placa de Petri estéril invertida para retirada das cabeças, utilizando-se pinças estéreis modelo Graefe serrilhada reta de sete centímetros (Figura 3). Após separar a cabeça do tórax, se observou basicamente três estruturas unidas, cabeça, probóscida e as glândulas salivares. Esse conjunto foi levado a um outro tubo contendo caldo BHI e macerado com auxílio de um tubo de vidro estéril de menor diâmetro que o anterior.

Em seguida, cada mosca foi colocada em outra placa de Petri invertida. Nela, separou-se o abdome do tórax através do uso de uma tesoura estéril, modelo Castroviejo curva (Figura 3), quando então, foi feita uma incisão bilateral entre o quarto e quinto segmentos do abdome usando agulhas hipodérmicas estéreis. O último segmento abdominal foi tracionado, usando pinças retas estéreis, lisas de 10 centímetros (Figura 3). Após esse procedimento, coletou-se a porção abdominal do tubo digestório (Figura 4). Os segmentos dissecados foram transferidos novamente para outro tubo contendo caldo BHI. Ao final desta etapa, o caldo utilizado no lavado externo das moscas coletadas, como também o caldo contendo o macerado do aparelho bucal e do macerado das porções abdominais do tubo digestório foram identificados e colocados em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para incubação.



**Figura 2.** Moscas sendo identificadas em microscópio estereoscópio próximo a Bico de Bunsen em Capela de Exaustão.

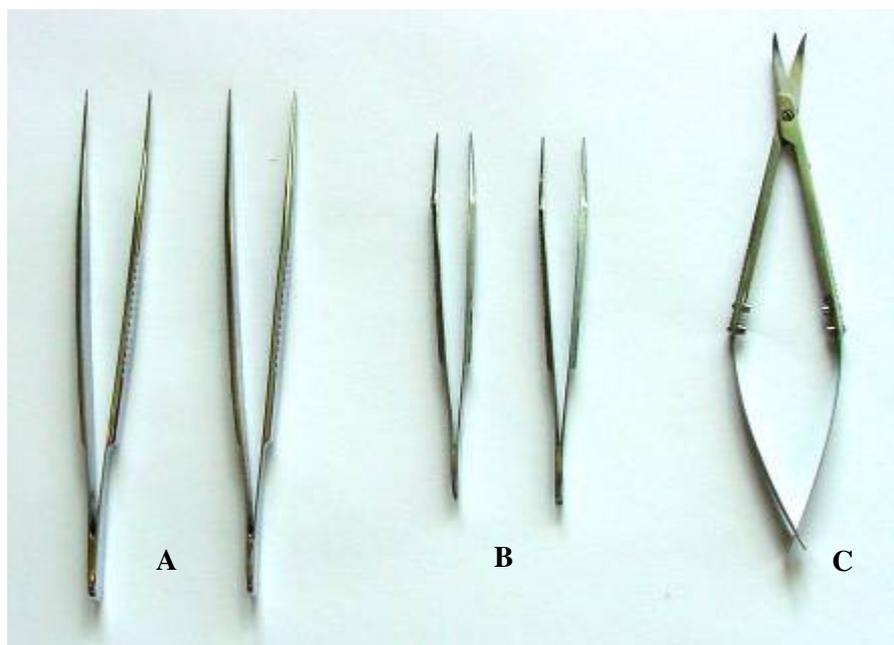
### 3.6. Coleta do Leite

No procedimento da coleta de leite foi realizada a limpeza dos tetos, sendo lavados com água e sabão neutro, em seguida, enxugados e desinfetados com álcool iodado para realização do “California Mastitis Test” (SCHALM; NORLANDER, 1957). Após a realização do CMT, foram coletadas as amostras de leite em frascos estéreis dos quartos mamários positivos, mantidas sob refrigeração e encaminhadas ao laboratório para isolamento bacteriano.

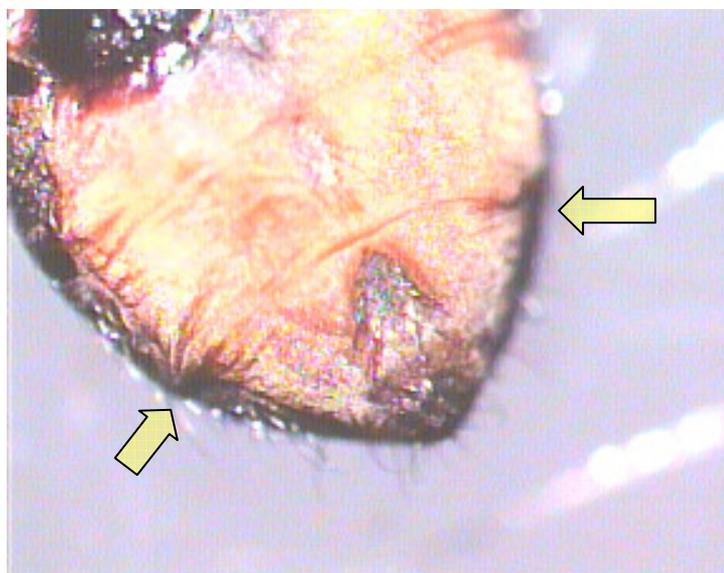
O resultado do teste CMT foi avaliado de acordo com o grau de gelatinização da mistura em partes iguais de leite e reagente. Os resultados estão relacionados à contagem de células somáticas (FONSECA; SANTOS, 2000), sendo expresso em cinco escores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Interpretação do “California Mastitis Test” modificado por Fonseca e Santos (2000).

<b>Escore</b>	<b>Viscosidade</b>
0	Ausente
-	Leve
+	Leve/Moderada
++	Moderada
+++	Intensa



**Figura 3.** Instrumental para a dissecção das moscas coletadas, pinças retas lisas de 10 centímetros (A), pinças modelo Graefe serrilhada reta de sete centímetros (B), e tesoura modelo Castroviejo curva de 10 centímetros (C).



**Figura 4.** Vista ventral do abdome de *Stomoxys calcitrans* coletadas em municípios do vale do Paraíba Fluminense, onde estão destacados com setas os pontos onde são feitas as incisões (entre os segmentos abdominais quatro e cinco) com o auxílio de agulhas hipodérmicas.

### 3.7 Isolamento Bacteriano e Caracterização Fisiológica

O isolamento e identificação bacteriana, a partir das amostras de moscas e de leite, foram realizados adaptando-se a metodologia descrita por Koneman et al. (2001).

#### 3.7.1 Moscas coletadas

Após o período de incubação em Caldo BHI, as amostras foram repicadas nos seguintes meios: Agar MacConkey e Agar EMB (Eosina Azul de Metileno) (Figura 5). Para isolamento dos gêneros *Salmonella* spp e *Shigella* spp, após o enriquecimento seletivo em caldo Tetrionato de Sódio, efetuou-se o repique no Ágar Salmonella-Shigella (SS). Em seguida as colônias foram observadas quanto a sua forma, cor, bordas, dentre outras características fenotípicas. Após diferenciação prévia das colônias, estas foram submetidas às provas de identificação preliminar: Coloração de Gram para observação das características morfológicas e tintoriais, teste de hidrólise ao KOH a 3% para confirmação do Gram e prova da catalase. Posteriormente, foram realizadas as seguintes provas de identificação: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro (Figura 6), comportamento em Agar SIM (Figura 7), produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares (Figura 8), teste Voges Proskauer (VP) (Figura 9), teste do Vermelho de Metila (VM) (Figura 10), redução do nitrato, produção de gelatinase (Figura 11), degradação de citrato (Figura 12) e malonato, e outros diferenciais de acordo com o microrganismo envolvido.

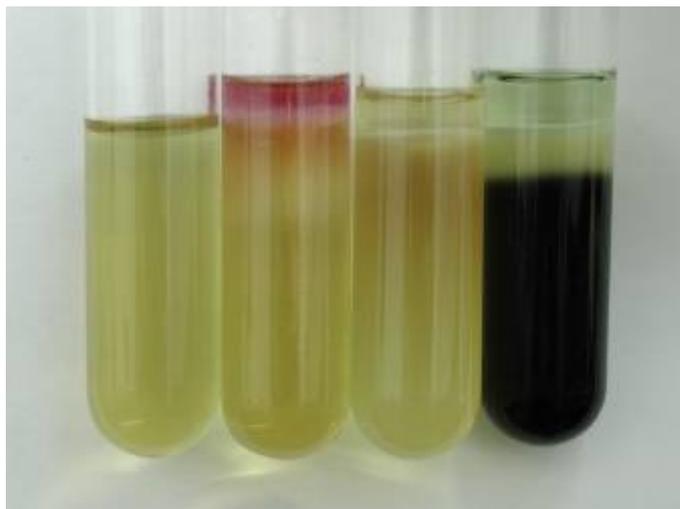
Ao final do processo de isolamento e identificação, foi avaliada a prevalência das espécies enterobacterianas em cada segmento estudado, nas cinco propriedades rurais visitadas em cada município, assim como taxa de infecção que foi calculada pela razão do número de moscas contaminadas por enterobactérias pelo total de moscas coletadas (N=200).



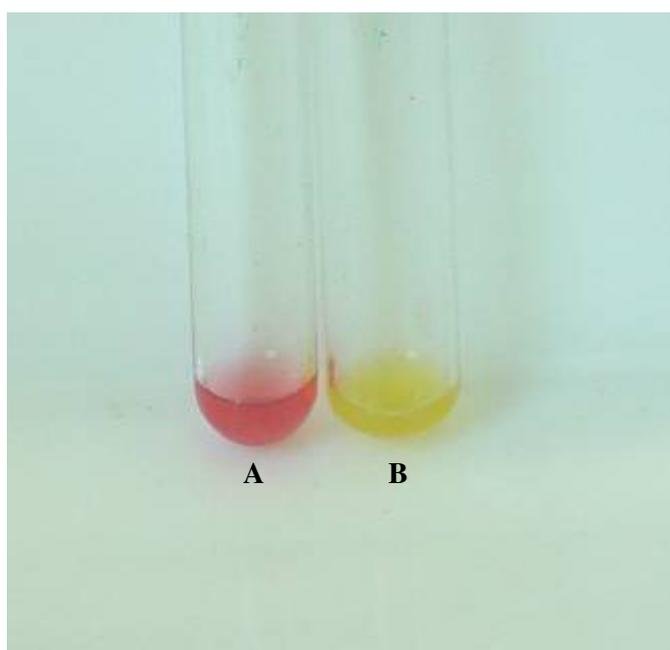
**Figura 5.** Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) com colônias características de *Escherichia coli*, centro negro e brilho verde metálico.



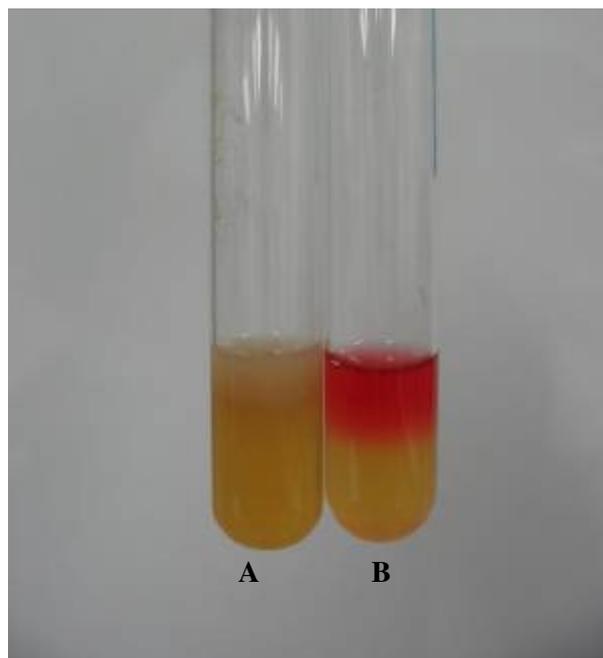
**Figura 6.** Diferentes resultados do Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) nos isolados bacterianos das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, RJ.



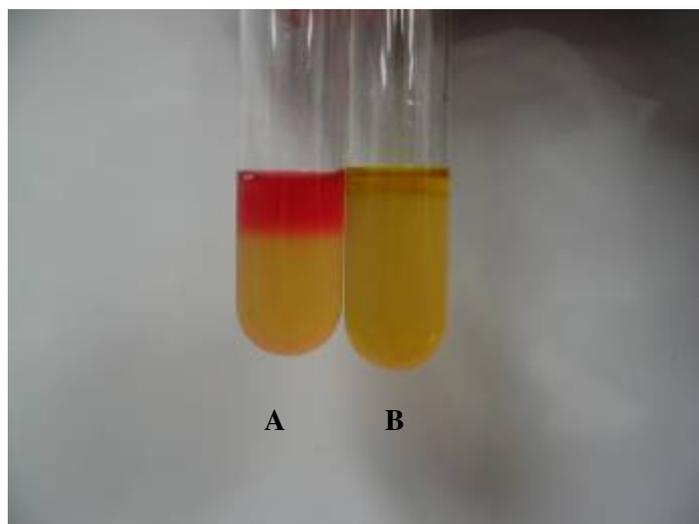
**Figura 7.** Diferentes resultados do Teste SIM nos isolados bacterianos das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, RJ.



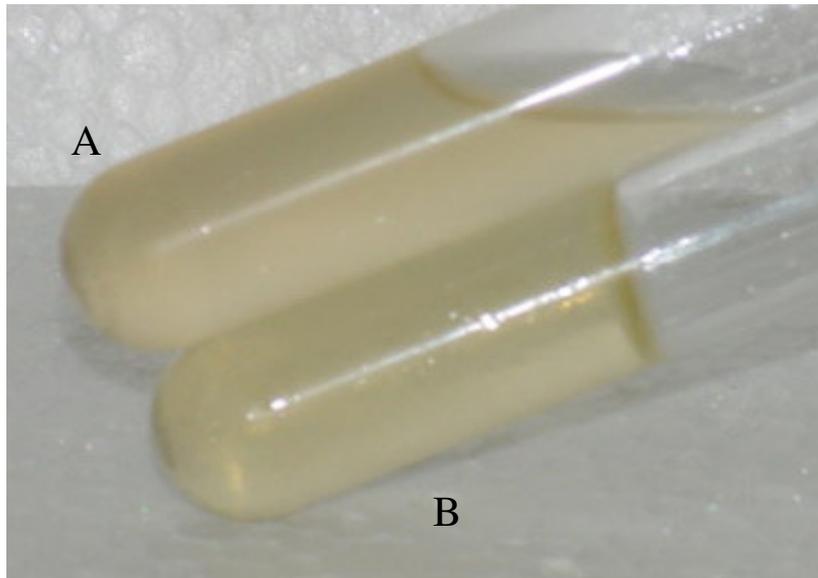
**Figura 8.** Prova da fermentação de açúcares realizada para identificação bacteriana das colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletados em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado negativo (A) e resultado positivo (B).



**Figura 9.** Prova de Voges Proskauer (VP) realizada para identificação bacteriana das colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletados em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado negativo (A) e resultado positivo (B).



**Figura 10.** Prova de Vermelho de Metila (VM) realizada para identificação bacteriana das colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletados em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B).



**Figura 11.** Prova da produção de gelatinase, realizada para identificação de colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado positivo (A) e negativo (B).



**Figura 12.** Prova da degradação do citrato, realizada para identificação de colônias isoladas das amostras de mosca e leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde se observa resultado positivo (A) e negativo (B).

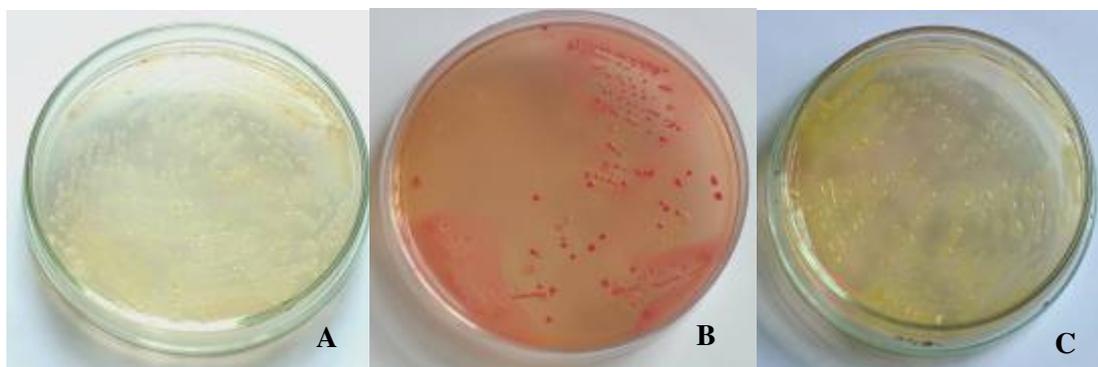
### 3.7.2 Leite coletado

Após o período de incubação, essas amostras foram repicadas nos seguintes meios: Agar BHI, Agar MacConkey e Agar Manitol Vermelho de Fenol (Figura 13). Em seguida, as colônias foram observadas quanto a sua forma, cor, bordas, dentre outras características fenotípicas. Após diferenciação inicial das colônias, estas foram submetidas às provas de identificação preliminar: Coloração de Gram, para observação das características morfológicas e tintoriais; teste de hidrólise ao KOH a 3%, para confirmação do Gram; e prova da catalase. Toda a etapa de identificação será realizada de acordo com o gênero isolado, utilizando-se provas bioquímicas específicas como recomendado por Koneman et al. (2001).

Ao final do processo de isolamento e identificação foi avaliada a prevalência das espécies bacterianas causadoras da mastite bovina no leite coletados das vacas nas cinco propriedades rurais visitadas de cada município.

#### 3.7.2.1 Avaliação do teste da sensibilidade antimicrobiana

Todas as espécies isoladas nas amostras de leite com mastite foram submetidas ao teste da sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) de acordo com as normas internacionais (CLSI, 2005). Foram empregados os seguintes antibióticos: Ampicilina (Amp, 10 mcg), Gentamicina (Gen, 10 mcg), Cloranfenicol (Clo, 30 mcg), Vancomicina (Van, 30 mcg), Norfloxacino (Nor, 10 mcg), Oxacilina (Oxa, 1 mcg), Amoxicilina associado com Ácido Clavulânico (Amc, 30 mcg) e Nitrofurantoína (Nit, 30 mcg). Para tanto, foram utilizadas as amostras padrões *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para padronização do ensaio. O resultado dos antibiogramas de cada propriedade era fornecido aos respectivos produtores rurais, onde eles eram orientados sobre os antibióticos específicos para cada vaca, assim como no uso correto dos medicamentos.



**Figura 13.** Agar Infuso Cérebro Coração (BHI) (A); Agar MacConkey (MC) (B) e Agar Manitol Vermelho de Fenol (MVF) (C) utilizados para isolamento bacteriano das amostras de leite coletadas em municípios da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense.

### **3.8 Caracterização Genotípica por Ensaio de Amplificação pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)**

Foram utilizadas todas as amostras de *E. coli* isoladas e identificadas a partir das moscas e amostras de leite com mastite coletadas nas 10 propriedades rurais visitadas dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

#### **3.8.1 Análise do polimorfismo dos segmentos de DNA obtidos por amplificação randômica (RAPD-PCR - “Random Amplification of Polymorphic DNA”)**

As etapas de extração do DNA bacteriano, da reação dos ensaios de amplificação randômica do DNA polimórfico e da análise dos produtos da amplificação foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Pacheco et al. (1997).

##### **3.8.1.1 Extração de DNA para a Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD)**

Para o ajuste da concentração das células bacterianas, uma alíquota de 20 µl do crescimento bacteriano em caldo de tripticaseína de soja (TSB-BBL) a 37°C/18-24hs foi diluída a 1:10 em água destilada ou salina para determinação da densidade ótica (D.O.) em 600nm. Para a D.O. de 0.4 de absorvância, uma alíquota de 200 µl foi centrifugada e ressuspendida em 900µl de água destilada estéril. A suspensão foi submetida à fervura por 10 minutos e o lisado bacteriano foi rapidamente centrifugada (spin) e utilizada como fonte de DNA nas reações de amplificação.

##### **3.8.1.2 Reação RAPD-PCR**

Um volume de 3µl do lisado bacteriano foi utilizado nas reações de amplificação juntamente com outros reagentes: 20mM Tris-HCl (pH 8.4) (Fermentas, Burlington, Canadá), 50mM HCl, 4mM de MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Burlington, Canadá) , 250µM (cada) dNTP (ABgene, Epsom, Reino Unido), 30 pmol de iniciador e 1U Taq polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá). Foram utilizados os seguintes iniciadores: 1247 (5'-AAGAGCCCGT-3'), 1253 (5'-GTTTCCGCCC-3'), 1281 (5'-AACGCGCAAC-3'), 1254 (5' CCGCAGCCAA 3'), M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), e A04 (5'-AATCGGGCTG-3') com a finalidade de se escolher três iniciadores que apresentarem maior número de bandas, intensidade e alta reprodutibilidade das bandas. A reação foi programada para desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto; seguida de 4 ciclos de 94 °C por 5 minutos; 37 °C por 5 minutos e 72 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 37 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e, extensão final de 72 °C por 10 minutos.

##### **3.8.1.3 Análise dos produtos de amplificação obtidos a partir do RAPD**

Os produtos da reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os perfis eletroforéticos detectados foram definidos pela intensidade, presença e ausência de bandas e, considerados diferentes quando, pelo menos, uma banda polimórfica fosse detectada. Foi utilizada marcadores de Peso Molecular de 1 kb.

Os perfis de amplificação foram submetidos à análise visual e automatizada com auxílio do software UVI soft image acquisition and analysis software empregando o programa UVIPro bandmap versão 11.9 (UVItec, Cambridge, Reino Unido).

### 3.8.2 Amplificação simultânea dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* (PCR-multiplex)

As etapas de extração do DNA bacteriano, da reação dos ensaios de reação de polimerase em cadeia e da análise dos produtos da amplificação foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por China et al. (1996).

#### 3.8.2.1 Extração do DNA para PCR-Multiplex

As amostras de *E. coli* foram semeadas em 5 mL de Caldo Müeller Hinton (MERCK) a 37 °C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, 300 µL da cultura foram centrifugados por 30 segundos em microcentrífuga e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em 50 µL de água destilada estéril, submetido a fervura por 10 minutos. O lisado bacteriano foi centrifugado por 30 segundos em microcentrífuga e o sobrenadante coletado e usado como fonte de DNA.

#### 3.8.2.2. Reação PCR-Multiplex

A detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* foi realizada por meio de ensaios de amplificação simultânea (PCR-Multiplex) conforme descrito por China et al. (1996).

Para a reação de PCR foi utilizado 1 U de *Taq* Polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá), 5 µL de 2 mM deoxinucleotídeo trifosfato- DNTP (ABgene, Epsom, Reino Unido), 5 mL de tampão 10X buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 1% Triton X-100) (Fermentas, Burlington, Canadá), 0.5 mL de cada iniciador (40 mM) (Bioneer, Seul, Coréia do Sul) (Tabela 2), e 5 µL de DNA para um volume final de 50 µL. As reações foram realizadas em um termociclador Eppendorf Master Cycler programado para 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos por 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. As amostras de *E. coli* E40705 (*stx1* e *eae* positivos) e E30121 (*stx2* e *eae* positivos) foram incluídas no estudo como controle de reação.

**Tabela 2.** Sequência dos iniciadores empregados na detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

Gene	Iniciador	Sequência	Tamanho dos “amplicons”
<i>eae</i>	B52	5' AGGCTTCGTCACAGTTG 3'	570 bp
	B53	5' CCATCGTCACCAGAGGA 3'	
<i>stx1</i>	B54	5' AGAGCGATGTTACGGTTTG 3'	388 bp
	B55	5' TTGCCCCCAGAGTGGATG 3'	
<i>stx2</i>	B56	5' TGGGTTTTTCTTCGGTATC 3'	807 bp
	B57	5' GACATTCTGGTTGACTCTCTT 3'	

### **3.8.2.3 Análise dos produtos de amplificação obtidos a partir do PCR-Multiplex**

Os “amplicons” foram analisados por meio da eletroforese em gel de agarose a 2%, seguido por coloração em brometo de etídeo (0,5 mg/mL), sendo utilizados marcadores de Peso Molecular de 100 kb para auxiliar a observação dos genes com tamanho pré-definidos, e visualizados em transiluminador ultravioleta e documentados pelo programa UVI PRO (UVI tec, Cambridge, Reino Unido).

### **3.9 Análise Estatística**

Este estudo foi avaliado de forma quantitativa, onde foram mensurados, as médias e desvios padrões de colônias isoladas por segmento, além da frequência das espécies bacterianas identificadas.

Foi utilizado o teste do Qui-quadrado, ao final deste estudo, para comparação da taxa de infecção dos segmentos em relação ao isolamento de colônias (SAMPAIO, 2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Propriedades Utilizadas no Estudo

Foram visitadas dez propriedades rurais, escolhidas por conveniência, sendo cinco situadas no município de Barra Mansa e outras cinco situadas no município de Resende. As visitas foram realizadas entre os meses de dezembro de 2005 e abril de 2007. Previamente às visitas, foram contatados extensionistas da EMATER-RJ, a fim de se coletar informações acerca das propriedades rurais e conhecimento acerca da presença da mosca dos estábulos. A partir deste conhecimento, foram visitadas as propriedades onde se produzia leite de vacas e, principalmente, onde as moscas dos estábulos se faziam presentes. As condições climáticas nesses municípios encontram-se na faixa que favorece o desenvolvimento da mosca dos estábulos, como verificado por Mello (1989) em condições de laboratório. Segundo este autor, à temperatura de 27°C e umidade relativa oscilando entre 70 e 80%, o desenvolvimento de *S. calcitrans* foi bastante favorável. Da mesma forma, Valgode (1990) verificou que a temperatura de 25 °C foi adequada para o desenvolvimento desta mosca.

#### 4.1.1. Caracterização das propriedades rurais visitadas

As cinco primeiras propriedades foram visitadas no município de Barra Mansa, durante os meses de dezembro de 2005 e outubro de 2006 e as cinco últimas no município de Resende, durante os meses de novembro de 2006 e abril de 2007, juntamente com um extensionista da EMATER-RJ. Os nomes das propriedades e dos responsáveis não serão mencionados a fim de se preservar a identidade dos mesmos.

Em Barra Mansa foi selecionado o distrito de Santa Rita de Cássia, onde se concentra a produção olerícola do município em conjunto com a criação de bovinos. Nestas propriedades se utiliza cama de frango para adubação, que é um meio favorável ao desenvolvimento da mosca dos estábulos (GUIMARÃES, 1984). Apesar da produção de verduras se concentrar nos meses mais frios e secos do ano (maio a outubro), se utiliza nesta época irrigação artificial (Figura 14), aumentando a umidade no local, favorecendo o desenvolvimento da mosca dos estábulos (JULIASSE; BITTENCOURT, 2000). Na maioria das propriedades também se criam bovinos e eqüídeos, nos quais esta mosca se alimenta com frequência (BITTENCOURT, 1998).

As informações referentes à produção leiteira das fazendas visitadas no município de Barra Mansa e Resende, segundo seus responsáveis, podem ser verificadas na Tabela 3.



**Figura 14.** Áreas de olericultura com irrigação artificial em propriedades rurais no Distrito de Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ.

**Tabela 3.** Dados sobre a produção leiteira das propriedades rurais visitadas no município de Barra Mansa e Resende, RJ.

<b>PROPRIEDADE</b>	<b>Litros/dia</b>	<b>Vacas lactação</b>	<b>Tipo de ordenha</b>	<b>Nº de ordenhas/dia</b>
Barra Mansa				
I	300	24	Manual	2
II	280	37	Manual	1
III	400	32	Manual	2
IV	250	24	Manual	2
V	100	15	Manual	1
Resende				
VI	1000	49	Mecânica	2
VII	100	12	Manual	1
VIII	160	21	Manual	1
IX	200	32	Manual	1
X	280	27	Manual	2

A primeira propriedade (P1) visitada, em Barra Mansa, situava-se nas coordenadas 0588833 leste e 7529607 norte, possuía piso cimentado no curral e apresentava-se relativamente limpo; os animais recebiam suplementação após a ordenha e a mosca dos estábulos se fazia presente.

Na segunda propriedade (P2), situada nas coordenadas 0586945 leste e 7519583 norte, foi observado acúmulo de esterco no piso de pedra do curral, os animais não recebiam nenhum tipo de suplementação após a ordenha e foram observados exemplares de mosca dos estábulos nos animais.

Na terceira propriedade visitada (P3), localizada nas coordenadas 0586491 leste e 7517674 norte, cujo piso do curral era de chão batido, com esterco espalhado pelo curral; os animais não recebiam nenhum tipo de suplementação após a ordenha e a mosca dos estábulos se fazia presente em grande número, devido à proximidade com áreas de olericultura, que eram adubadas com cama de frango, que é um dos meios mais favoráveis ao desenvolvimento desta mosca.

Na quarta propriedade (P4), que se situava nas coordenadas 0586904 leste e 7519868 norte, foi observado um curral com piso de pedra, onde se acumulava grande quantidade de esterco, sacos de cama de frango na entrada do curral, que segundo o reiteiro não eram usados na alimentação animal. Os animais desta propriedade recebiam suplementação mineral após a ordenha, estando presentes em grande número a mosca dos estábulos e outras moscas, provavelmente devido à proximidade com áreas de olericultura, como já discutido anteriormente, sacos contendo cama de frango e a um depósito de cevada ao lado do curral (Figura 15).

A quinta propriedade (P5), situada nas coordenadas 0586491 leste e 7518248 norte, foi a propriedade com o menor índice de higiene dentre as visitadas, onde foi observado grande quantidade de lama e esterco acumulado no curral com piso de chão batido. Os animais não

recebiam nenhum tipo de suplementação após a ordenha e a mosca dos estábulos se fazia presente (Figura 16).

A sexta propriedade visitada (P6), primeira no município de Resende, e que se situava nas coordenadas 0570459 leste e 7531933 norte, foi a única das dez propriedades visitadas onde foi observada a limpeza prévia dos tetos, assim como um correto manejo higiênico-sanitário dos animais. Nessa propriedade foi observado um curral com piso emborrachado, com constante limpeza do esterco e da área de ordenha. Os animais desta propriedade recebiam concentrado após a ordenha. A mosca dos estábulos se fazia presente em grande número, provavelmente devido ao acúmulo ao lado do curral de palha de café proveniente da propriedade, que também é um dos substratos de desenvolvimento desta mosca.

Na sétima propriedade (P7) (0570625 leste e 7532479 norte) foi observado um curral com grande quantidade de esterco e os animais não recebiam nenhum tipo de suplementação após a ordenha e a mosca dos estábulos se fazia presente, provavelmente devido a proximidade com a anterior.

Na oitava propriedade visitada (P8), situada nas coordenadas 0570884 leste e 7532776 norte, que possuía um curral com piso de terra, com algumas áreas alagadas, devido à chuva recente que havia caído, e com acúmulo de esterco por todo o curral. Os animais não recebiam nenhum tipo de suplementação após a ordenha e a mosca dos estábulos se fazia presente, visto que também era próxima à primeira fazenda visitada de Resende.

A nona propriedade visitada (P9), situava-se nas coordenadas 0571220 leste e 7534167 norte. Nessa propriedade foi verificado um curral com esterco acumulado, os



**Figura 15.** Animais apresentando área de alopecia nas extremidades dos membros (A) e sacos com cama de frango na entrada do curral (B) em propriedade rural no Distrito de Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ.



**Figura 16.** Propriedade rural onde foi verificado acúmulo de fezes no curral e baixo nível de higiene na ordenha em Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ.

animais não recebiam nenhum tipo de suplementação após a ordenha e a mosca dos estábulos se fazia presente.

A décima propriedade (P10) localizava-se nas coordenadas 0570207 leste e 7537543 norte, onde foi observado acúmulo de esterco por todo o curral e cujo piso cimentado não recebia uma limpeza correta, os animais recebiam suplementação mineral após a ordenha e a mosca dos estábulos se fazia presente.

#### **4.2 Avaliação da Mastite Bovina e Sensibilidade Antimicrobiana nas Propriedades Visitadas**

Em todas as propriedades visitadas, após a realização do “California Mastitis Test” (CMT), constatou-se mastite em todos os rebanhos testados. Os resultados referentes à identificação dos animais, quartos positivos, escore do CMT, isolamento e identificação dos agentes nas propriedades estudadas estão dispostos no Quadro 1. A distribuição da resistência *in vitro* dos isolados das amostras de leite de vacas com mastite das 10 propriedades rurais visitadas, frente aos antibióticos estudados, pode ser verificada na Tabela 4.

Na primeira propriedade visitada, 25% das vacas examinadas (N=24) apresentavam 10 quartos afetados, cujos agentes mais frequentes foram: estafilococos coagulase negativo (ECN), verificado em 50% dos quartos positivos; *Staphylococcus aureus aureus* (20%) e *E. coli* (20%). Nesta propriedade, dentre os antibióticos testados, os agentes isolados apresentaram maior resistência à ampicilina (90%); seguido pela gentamina (80%); cloranfenicol (70%); amoxicilina associada com ácido clavulânico (50%); ciprofloxacino e norfloxacino (40%); oxacilina, vancomicina e ampicilina (30%) respectivamente.

Na segunda propriedade, 16,22% dos animais em lactação (N=37) apresentaram mastite. Nos animais afetados foram observados sete quartos mamários positivos, sendo isolado, principalmente, *S. aureus aureus* (42,86%) e ECN (28,57%). No que se refere à resistência aos antibióticos avaliados, foi verificado que 54,55% dos agentes isolados apresentaram resistência à vancomicina, nitrofurantoína, ampicilina e gentamicina, respectivamente; 45,45% ao cloranfenicol; 18,18% ao ciprofloxacino e norfloxacino, respectivamente; e 9,09% à amoxicilina com ácido clavulânico. No entanto, nenhum dos agentes isolados na P2 se mostrou resistente à oxacilina.

A terceira propriedade apresentava prevalência de 37,5% (N=32) de vacas com mastite. Nesta propriedade foram verificados 14 quartos mamários afetados, sendo *S. aureus aureus* (30,77%) o microrganismo mais frequente, seguido por *Staphylococcus intermedius* e ECN (23,08% cada um). Dos agentes isolados, 84,62% foram resistentes à ampicilina; 46,15% à gentamicina; 30,77% ao ciprofloxacino; 23,08% à oxacilina e vancomicina, simultaneamente; 15,38% ao norfloxacino; e 7,69% a cada um dos antibióticos a seguir, isto é, amoxicilina com ácido clavulânico, nitrofurantoína e cloranfenicol.

**Quadro 1.** Dados referentes à identificação dos animais, propriedade visitada, quarto mamário com mastite, escore no teste “California Mastitis Test” (CMT) e agente identificado em amostras de leite com mastite, coletadas nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ. (Continua)

Animal	Propriedade	Quarto Mamário*	CMT**	Agente Identificado
1	I	PD	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
2	I	PE	-	Bacilo Gram Positivo
		PD	+++	ECN***
3	I	PE	+	<i>Escherichia coli</i>
4	I	PE	+	ECN
		AD	++	ECN
		PD	+++	ECN
		AE	++	ECN
5	I	AD	+++	<i>Escherichia coli</i>
6	I	PE	-	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
7	II	AD	+++	<i>Streptococcus spp</i>
				<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
8	II	AE	++	ECN
				<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
				<i>Staphylococcus intermedius</i>
9	II	AE	+	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		AD	++	ECN
10	II	AE	+++	<i>Staphylococcus intermedius</i>
				<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
				ECN
11	II	PD	++	ECN
				<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
12	II	PE	++	<i>Escherichia coli</i>
				<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
13	III	AE	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
14	III	PD	+	ECN
15	III	AD	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		PE	+	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
16	III	PD	++	<i>Escherichia coli</i>
17	III	PD	++	ECN
18	III	AD	+	<i>Streptococcus spp</i>
19	III	AE	+++	<i>Pseudomonas spp</i>
20	III	AE	+	<i>Staphylococcus intermedius</i>
21	III	AD	+	ECN
22	III	AD	++	<i>Staphylococcus intermedius</i>
		PD	++	<i>Staphylococcus intermedius</i>
23	III	AD	+++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
24	IV	AD	++	<i>Escherichia coli</i>
				ECN
		PD	++	<i>Escherichia coli</i>
25	IV	AD	+++	ECN
				<i>Bacilo Gram Positivo</i>
				<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
26	IV	PE	-	<i>Staphylococcus intermedius</i>
				<i>Escherichia coli</i>
27	IV	AE	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
				<i>Escherichia coli</i>
28	IV	PD	+	<i>Escherichia coli</i>
29	V	AD	+++	<i>Streptococcus spp</i>
		PD	+	ECN
30	V	PE	+++	<i>Streptococcus spp.</i>
31	V	PE	+++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>

\* Quartos mamários Anteriores Direito (AD) e Esquerdo (AE), e Posteriores Direito (PD) e Esquerdo (PE);

\*\* Classificação CMT segundo Fonseca; Santos (2000), \*\*\* Estafilococos Coagulase Negativo

**Quadro 1.** Continuação.

Animal	Propriedade	Quarto Mamário*	CMT**	Agente Identificado
32	VI	AE	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		PD	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		PE	+++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
				ECN***
33	VI	PE	++	<i>Staphylococcus intermedius</i>
34	VI	PD	+	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
		PE	++	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
35	VII	PD	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
				<i>Streptococcus spp.</i>
36	VII	AD	++	<i>Escherichia coli</i>
		PE	+	<i>Escherichia coli</i>
37	VII	PE	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
				ECN
38	VIII	PE	++	<i>Streptococcus spp</i>
39	VIII	PE	++	ECN
		AE	++	ECN
40	IX	PD	-	<i>Proteus mirabilis</i>
41	IX	AD	++	Bacilo Gram Positivo
42	IX	AE	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		PD	++	<i>Staphylococcus intermedius</i>
		AD	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
43	IX	AE	+	<i>Escherichia coli</i>
		AD	++	<i>Escherichia coli</i>
44	IX	PD	-	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
45	IX	PE	++	<i>Streptococcus spp</i>
		PD	++	ECN
		AD	+++	ECN
46	X	PD	+++	<i>Streptococcus spp</i>
47	X	AD	+++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		AE	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		PD	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
		PE	++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
48	X	AE	++	ECN
		AD	++	ECN
49	X	AE	+++	<i>Escherichia coli</i>
50	X	PE	+	ECN
51	X	AD	++	<i>Klebsiella oxytoca</i>
52	XX	PE	++	<i>Streptococcus spp</i>
53	X	PE	+++	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>
54	X	AD	++	ECN

\* Quartos mamários Anteriores Direito (AD) e Esquerdo (AE), e Posteriores Direito (PD) e Esquerdo (PE);

\*\* Classificação CMT segundo Fonseca; Santos (2000), \*\*\* Estafilococos Coagulase Negativo

**Tabela 4.** Perfil de resistência, frente aos antimicrobianos avaliados, dos agentes bacterianos identificados (N=92) de leite com mastite nas amostras coletadas (N=78) de propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

Antimicrobiano	Nº de Resistentes	%
Ampicilina	59	64,13
Gentamicina	52	56,52
Cloranfenicol	34	36,96
Vancomicina	30	32,61
Ciprofloxacina	27	29,35
Nitrofurantoína	24	26,09
Oxacilina	22	23,91
Amoxicilina / Ác. Clavulânico	21	22,83
Norfloxacina	18	19,57

Na quarta fazenda visitada 20,83% das vacas lactantes (N=24) apresentavam mastite, diagnosticada em sete quartos mamários. Sendo os agentes etiológicos mais isolados *E. coli* em 45,45% dos casos; e ECN e *S. aureus aureus*, que foram isoladas em 18,18% das amostras, respectivamente. Destes agentes identificados, 54,55% foram resistentes a vancomicina e nitrofurantoína, respectivamente; 36,36% à ampicilina e oxacilina, simultaneamente; 27,27% à gentamicina; e 9,09% à ciprofloxacina e amoxicilina com ácido clavulânico. No entanto, nenhum agente isolado apresentou resistência ao cloranfenicol e norfloxacina.

A última propriedade visitada (P5) no município de Barra Mansa possuía 20% (N=15) das vacas em ordenha com mastite, sendo diagnosticado em quatro quartos mamários. Os agentes mais isolados foram *Streptococcus* spp em 50% das amostras; seguido por ECN e *S. aureus aureus* (25%) simultaneamente. No que tange a resistência aos antimicrobianos testados, 75% das amostras apresentaram resistência ao cloranfenicol e gentamicina, respectivamente; 50% à ampicilina; e 25% ao mesmo tempo à oxacilina, amoxicilina com ácido clavulânico e vancomicina. No entanto, nenhum agente isolado nas amostras apresentou resistência à nitrofurantoína, ciprofloxacina e norfloxacina.

Na primeira propriedade visitada em Resende, que apresentava melhores índices de higiene do ambiente e da ordenha, observou-se que apenas 6,12% das vacas examinadas (N=49) apresentavam mastite, ou seja, menor prevalência desta enfermidade dentre todas as propriedades visitadas. Os agentes isolados, nos seis quartos mamários, mais prevalentes foram: *S. aureus aureus* (42,86%); e *Staphylococcus schleiferi* (28,57%). Dos agentes identificados, 83,33% apresentaram resistência à ampicilina; 66,67% à oxacilina, vancomicina e ciprofloxacina, simultaneamente; e 33,33% demonstraram ser resistentes à amoxicilina com ácido clavulânico, cloranfenicol, gentamicina e norfloxacina, respectivamente. No entanto, nenhum agente isolado foi resistente a nitrofurantoína.

Na sétima propriedade foi diagnosticada mastite em quatro quartos mamários de 25% das vacas em linha de ordenha (N=12), nas quais, os agentes mais prevalentes foram: *S. aureus aureus* e *E. coli* (33,33%) respectivamente; e ECN e *Streptococcus* spp. (16,67%) respectivamente. No que se refere à resistência destes agentes frente aos antibióticos avaliados, todos eles foram resistentes à ampicilina; 75% à ciprofloxacina; 50% foram resistentes, respectivamente, à nitrofurantoína, gentamicina e norfloxacina; e 25% à oxacilina, amoxicilina com ácido clavulânico, vancomicina e cloranfenicol, simultaneamente.

Verificou-se na oitava propriedade, 9,52% das vacas em lactação (N=21) com teste CMT positivo (três quartos afetados). Os agentes isolados das amostras de mastite foram ECN (66,66%) e *Streptococcus* spp (33,33%). Destes agentes, todos foram resistentes à gentamicina; 66,66% foram resistentes à ampicilina, ciprofloxacina e cloranfenicol, respectivamente; e 33,33% dos agentes à oxacilina, amoxicilina com ácido clavulânico e vancomicina. Os antibióticos nitrofurantoína e norfloxacin seriam eficazes no tratamento, visto que nenhum agente isolado foi resistente aos mesmos.

Na penúltima propriedade visitada (P9), 21,88% do rebanho leiteiro em lactação positivo para o CMT (N=32) apresentou 11 quartos mamários com mastite. Os agentes etiológicos mais frequentes foram *S. aureus aureus* (27,27%); *E. coli* e ECN (18,18%) respectivamente. Destes agentes, verificou-se que 81,82% foram resistentes à gentamicina; 63,64% à cloranfenicol e ampicilina, respectivamente; 27,27% à amoxicilina com ácido clavulânico, vancomicina, ciprofloxacina e norfloxacin, respectivamente; e 18,18% à oxacilina e nitrofurantoína, simultaneamente.

Na última propriedade visitada, foi observada a prevalência de 33,33% de mastite no rebanho em lactação, diagnosticado em 13 quartos mamários. Os agentes etiológicos mais observados foram *S. aureus aureus* (38,46%); seguido pelos ECN (30,77%). Quando foi avaliada a resistência destes agentes aos antimicrobianos testados, foi verificada maior resistência à gentamicina (76,92%); seguida pela ampicilina com 69,23% de resistência; cloranfenicol (46,15%); amoxicilina com ácido clavulânico (38,46%); nitrofurantoína (30,77%); norfloxacin e oxacilina (23,08%) respectivamente e 15,38% dos agentes apresentaram resistência à vancomicina.

De uma forma geral, verificou-se que os microrganismos mais frequentes, identificados a partir das amostras coletadas, pertenciam à família Micrococcaceae (68,48%), sendo mais frequentes *S. aureus aureus* e ECN. A segunda família mais verificada foi a Enterobacteriaceae (17,40%), onde a espécie mais observada foi *E. coli* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Prevalência da microbiota bacteriana isolada das amostras coletadas de leite com mastite das 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

Agente Etiológico	Amostras	
	N	%
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	28	30,43
Estafilococo Coagulase Negativo	25	27,17
<i>Escherichia coli</i>	14	15,22
<i>Streptococcus</i> spp	9	9,78
<i>Staphylococcus intermedius</i>	8	8,70
Bacilo Gram Positivo	3	3,26
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	2	2,17
<i>Pseudomonas</i> spp	1	1,09
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,09
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,09
<b>TOTAL</b>	<b>92</b>	<b>100</b>

Os dados observados neste estudo coincidem com o observado por outros autores, a exemplo dos resultados verificados por Moraes et al. (2004), na mesma microrregião do presente estudo, em que as famílias Micrococcaceae e Enterobacteriaceae foram as mais frequentes. Em estudos realizados nos estados de Pernambuco e Piauí por Barbalho e Mota (2001) e Ferreira et al. (2007), verificou-se, a exemplo do presente estudo, que as espécies da

família Micrococcaceae apresentaram maior frequência, sendo responsáveis pelo maior número de casos de mastite bovina nas propriedades visitadas.

No levantamento realizado por Barbalho e Mota (2001), as espécies do grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivo (20,16%) foram as mais observadas, enquanto que Ferreira et al. (2007) verificaram *Staphylococcus* spp em 74,60% dos casos no Piauí. Apesar dos autores não terem realizado a identificação até espécie, estes estudos corroboram os verificados no presente estudo e por Zecconi e Hahn (2000) e Fagundes (2007), cujo agente mais freqüente foi *S. aureus aureus*, espécie do gênero *Staphylococcus*, que também é coagulase positiva.

Outro grupo da família Micrococcaceae, os estafilococos coagulase-negativos se destacaram como agentes etiológicos das mastites na região estudada, corroborando os resultados obtidos por Pardo et al. (1998), Costa et al. (1999) e Laffranchi et al. (2001).

No que se refere à frequência de *E. coli* como agente etiológico das mastites bacterianas bovinas, os resultados deste estudo se assemelham àqueles obtidos por Bexiga et al. (2005) e Ferreira et al. (2007) que verificaram prevalências de 7,9% e 10,71%, respectivamente. No entanto, resultados de outros autores diferem do observado neste trabalho, onde Barbalho e Motta (2001) não identificaram nenhum caso de mastite em Pernambuco causado por *E. coli*. Por outro lado, Shpigel et al. (1998) relataram que 60% dos casos de mastite em Israel eram causados por *E. coli*, cuja elevada frequência pode estar relacionada a maior concentração de animais, decorrente do manejo adotado neste país, onde se utiliza principalmente o sistema de livre estabulação (“free stall”).

No presente estudo, foi verificada uma prevalência de apenas 9,78% de casos de mastite causados por espécies de *Streptococcus*. Este resultado difere dos estudos de Bexiga et al. (2005) e Bradley et al. (2007) que observaram uma prevalência de 31,5% e 23,5% de casos de mastite causados por espécies de *Streptococcus* em Portugal e no Reino Unido, respectivamente. Este fato possivelmente ocorre devido a diferenças ecológicas nas regiões estudadas como também nas características imunológicas nos rebanhos estudados.

Na comparação dos resultados verificados em cada município, observou-se que as mesmas cinco espécies bacterianas apresentaram maior prevalência. No entanto, como se pode observar nas Tabelas 6 e 7, a microbiota bacteriana identificada nos referidos municípios apresenta diferença relacionada às espécies menos freqüentes.

Dentre os agentes com menor prevalência identificados neste estudo, foram verificadas espécies que eventualmente são isoladas de casos de mastite em bovinos, como *Pseudomonas* spp e alguns coliformes, que são agentes oportunistas e têm potencial de causar mastite, principalmente, em animais imunocomprometidos, como relatado por Jasper et al. (1975), Todhunter et al. (1990) e Barkema et al. (1998).

**Tabela 6.** Frequência dos agentes isolados das amostras de leite com mastite coletadas das cinco propriedades rurais do município de Barra Mansa, RJ.

<b>Espécie Identificada</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	15	28,85
ECN	15	28,85
<i>Escherichia coli</i>	9	17,31
<i>Staphylococcus intermedius</i>	6	11,54
<i>Streptococcus</i> spp	4	7,69
Bacilo Gram Positivo	2	3,85
<i>Pseudomonas</i> spp	1	1,92
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>100</b>

**Tabela 7.** Frequência dos agentes isolados das amostras de leite com mastite coletadas das cinco propriedades rurais do município de Resende, RJ.

<b>Espécie Identificada</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	13	32,5
ECN	10	25
<i>Escherichia coli</i>	5	12,5
<i>Streptococcus spp</i>	5	12,5
<i>Staphylococcus intermedius</i>	2	5
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	2	5
Bacilo Gram Positivo	1	2,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2,5
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,5
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

A taxa de infecção por mastite no rebanho leiteiro das propriedades rurais visitadas em ambos os municípios foi de 20,63%. Quando os municípios foram avaliados separadamente, foi observado em Barra Mansa que 24,24% dos animais apresentavam mastite bacteriana bovina, enquanto que em Resende, 17,02% dos animais foram diagnosticados com a enfermidade. A taxa de infecção observada nos municípios está um pouco abaixo daquela verificada por outros autores. Ribeiro et al. (2003) observaram 37,69% de vacas com mastite bacteriana em propriedades localizadas no sul do estado do Rio Grande do Sul. Ferreira et al. (2007), em Teresina (PI), verificaram que 41,10% dos animais avaliados apresentaram a enfermidade. Já Laranja e Machado (1994) relataram que em granjas leiteiras do estado de São Paulo foi observada uma taxa de 50,97% de animais com mastite bacteriana. Esta diferença possivelmente se deve ao fato das propriedades visitadas no presente estudo possuírem rebanho de animais sem padrão racial definido e que geralmente são mais rústicos e resistentes aos agentes causadores de mastite bacteriana bovina, explicando assim uma menor prevalência nesses municípios (ALMEIDA et al., 2005).

As propriedades que apresentaram mais casos de mastite foram a primeira, terceira, sétima e décima, nas quais verificaram-se taxas de infecção, nos animais em lactação, iguais ou superiores a 25%. Nestas propriedades não foi observado um correto manejo higiênico sanitário na ordenha e a limpeza dos respectivos currais era precária, fatores que contribuem para que a enfermidade esteja presente numa grande parte do rebanho destas fazendas. Estes fatores acarretam em prejuízos aos produtores rurais, visto que a mastite acarreta em diminuição na produção leiteira, gasto para o tratamento e o leite não deve ser utilizado para consumo humano (BUENO et al., 2002).

A propriedade que apresentou menor índice de mastite no seu rebanho foi a sexta fazenda visitada, onde se verificou que apenas 6,12% dos animais foram positivos para o teste CMT. Este fato pode ser explicado pela maior higiene na ordenha e a preocupação do referido produtor na limpeza do curral, bem como o fornecimento de concentrado após a ordenha fazendo com que as vacas não deitassem no chão após a mesma. Demonstrando assim que cuidados higiênico-sanitários são eficazes na prevenção desta enfermidade (DIAS, 2007).

Quando avaliado o número de vacas em lactação e com mastite por propriedade, verificou-se no município de Barra Mansa que as fazendas possuíam 26,4 vacas lactantes (S= 8,44) e 6,4 animais com mastite em média. Enquanto que as propriedades de Resende apresentavam 28,2 animais (S=13,81) e 4,8 vacas com mastite em média, ou seja, foi verificada maior prevalência de mastite no rebanho leiteiro das propriedades visitadas em Barra Mansa, mesmo possuindo menos animais em lactação, fato que pode ser explicado pelos menores cuidados com a higiene das instalações nestas propriedades.

No que se refere aos escores do teste CMT verificados no presente estudo (Tabela 8), foi verificado que a maioria dos quartos apresentou escore dois (++) no critério de julgamento estipulado por Fonseca e Santos (2000). Apesar de autores de outros estudos (LARANJA; MACHADO, 1994; BEXIGA et al., 1994; FERREIRA et al., 2007) utilizarem metodologia distinta da utilizada neste estudo, os mesmos também observaram predomínio de mastite subclínica de grau médio (++), que favorece a disseminação e identificação desta enfermidade nos rebanhos, pois a produção leiteira não apresenta um decréscimo tão intenso, como verificado nos escores superiores.

**Tabela 8.** Frequência dos escores California Mastit Test das amostras de leite com mastite coletadas das 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

<b>Escore CMT</b>	<b>Quartos Mamários</b>	<b>%</b>
-	5	6,41
+	14	17,95
++	42	53,85
+++	17	21,79
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>	<b>100</b>

Os quartos mamários mais afetados nos rebanhos estudados foram o anterior direito e posterior esquerdo, sem, no entanto, ter sido observada grande diferença frente aos demais. Estes resultados coincidem com aqueles citados por Souto (2006), que verificou distribuição uniforme de mastite em todos quartos mamários.

**Tabela 9.** Frequência dos quartos mamários California Mastit Test-positivos examinados nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

<b>Quarto Mamário com Mastite</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Anterior Esquerdo	17	21,79
Anterior Direito	21	26,92
Posterior Esquerdo	21	26,92
Posterior Direito	19	24,35
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>	<b>100</b>

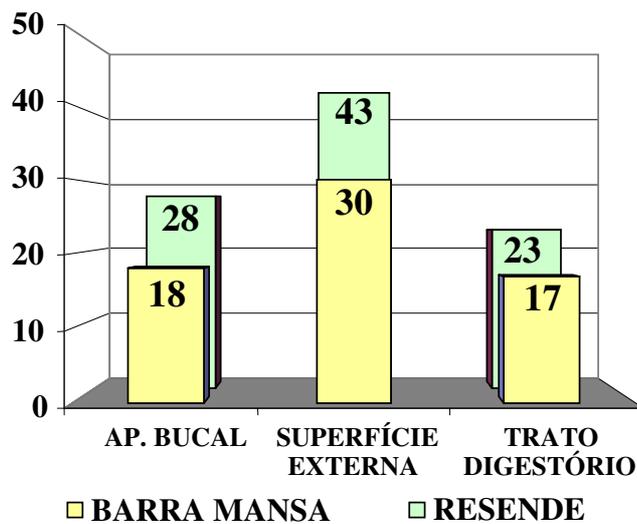
De acordo com Bueno et al. (2002), o prejuízo com a diminuição da produção leiteira varia de acordo com o escore do teste CMT. Onde, adaptando-se a metodologia utilizada por Costa (2000), os escores – ou + (negativo ou uma cruz) representava uma perda na produção em torno de 14%, o escore ++ (duas cruzes) representavam uma perda de 22% e o escore +++ (três cruzes) representava uma perda aproximada de 36% na produção diária de leite por vaca.

### **4.3 Avaliação da Microbiota Enterobacteriana em *Stomoxys calcitrans***

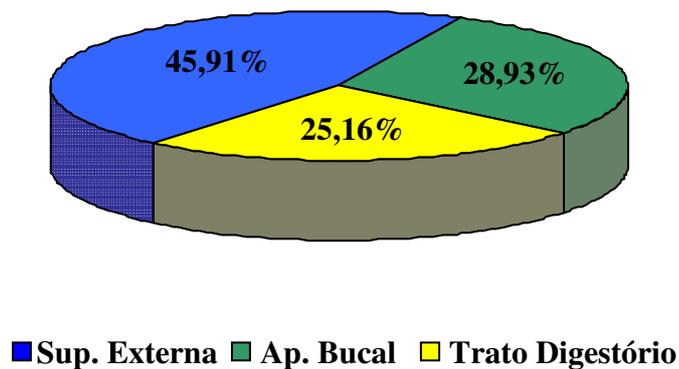
Após o isolamento e identificação das colônias, foi verificado um total de 159 agentes nos três segmentos das 200 moscas coletadas. Destes, 46 foram isolados a partir do aparelho bucal, 73 foram observados de culturas da superfície externa e 40 foram verificadas nos macerados do trato digestório abdominal. Os dados referentes às colônias identificadas a partir dos três segmentos avaliados e o número de colônias observadas em cada segmento estão dispostos nas Tabelas 10, 11, 12 e 13 e Figuras 17 e 18, respectivamente.

De acordo com os resultados gerais observados, a superfície externa foi o segmento onde as enterobactérias foram mais freqüentes (45,91%). Em segundo lugar, o aparelho bucal apresentou 28,93% do total de colônias isoladas, seguido pelo trato digestório abdominal com 25,16% (Figura 18). No que se refere à prevalência de agentes enterobacterianos nos três segmentos estudados, verificou-se que houve diferença significativa entre os mesmos ( $p < 0,01$ ). Neste estudo, a taxa de infecção das moscas por enterobactérias foi de 56%, onde 112 moscas coletadas apresentaram agentes desta família em algum dos segmentos avaliados.

Estes resultados condizem com o verificado por Castro et al. (2007), confirmando que a superfície externa é o segmento mais sujeito a apresentar agentes bacterianos devido ao contato direto com ambientes potencialmente contaminados. Os outros segmentos possivelmente apresentaram menor quantidade de microrganismos isolados devido à presença de substâncias secretadas que reduziriam a microbiota nestes segmentos (NAZNI et al., 2005).



**Figura 17.** Número de colônias isoladas nos três segmentos estudados das moscas coletadas nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.



**Figura 18.** Frequência de isolamento de enterobactérias entre os segmentos da mosca dos estábulos capturadas nas 10 propriedades rurais dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

**Tabela 10.** Frequência de enterobactérias nos três segmentos avaliados das moscas coletadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

<b>AGENTE</b>	<b>N</b>	<b>FREQÜÊNCIA</b>
<i>Escherichia coli</i>	44	27,67%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	12,58%
<i>Enterobacter cloacae</i>	18	11,32%
<i>Salmonella spp</i>	12	7,55%
<i>Shigella spp</i>	7	4,40%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	5	3,14%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	3,14%
<i>Serratia odorifera</i>	5	3,14%
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	4	2,52%
<i>Morganella morganii</i>	4	2,52%
<i>Proteus mirabilis</i>	4	2,52%
<i>Cedecea lapagei</i>	3	1,89%
<i>Citrobacter diversus</i>	3	1,89%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	1,89%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	3	1,89%
<i>Hafnia alvei</i>	3	1,89%
<i>Proteus spp</i>	2	1,26%
<i>Serratia entomophila</i>	2	1,26%
<i>Serratia ficaria</i>	2	1,26%
<i>Serratia marcescens</i>	2	1,26%
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	1	0,63%
<i>Enterobacter spp</i>	1	0,63%
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0,63%
<i>Erwinia quercina</i>	1	0,63%
<i>Erwinia stewartii</i>	1	0,63%
<i>Kluyvera spp</i>	1	0,63%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0,63%
<i>Serratia spp</i>	1	0,63%
<b>TOTAL</b>	<b>159</b>	<b>100%</b>

**Tabela 11.** Frequência de enterobactérias na superfície externa das moscas coletadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

<b>AGENTE</b>	<b>N</b>	<b>FREQÜÊNCIA</b>
<i>Escherichia coli</i>	23	31,51%
<i>Salmonella</i> spp	9	12,33%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	7	9,59%
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8,22%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	5,48%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	4,11%
<i>Morganella morganii</i>	3	4,11%
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	2	2,74%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	2,74%
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2,74%
<i>Serratia odorifera</i>	2	2,74%
<i>Shiegella</i> spp	2	2,74%
<i>Cedecea lapagei</i>	1	1,37%
<i>Citrobacter diversus</i>	1	1,37%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	1,37%
<i>Kluyvera</i> spp	1	1,37%
<i>Proteus</i> spp	1	1,37%
<i>Serratia entomophila</i>	1	1,37%
<i>Serratia marcescens</i>	1	1,37%
<i>Serratia</i> spp	1	1,37%
<b>TOTAL</b>	<b>73</b>	<b>100%</b>

**Tabela 12.** Frequência de enterobactérias verificadas no aparelho bucal das moscas coletadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

<b>AGENTE</b>	<b>N</b>	<b>FREQÜÊNCIA</b>
<i>Escherichia coli</i>	14	30,43%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	6	13,04%
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	8,70%
<i>Shigella</i> spp	4	8,70%
<i>Proteus mirabilis</i>	2	4,35%
<i>Serratia ficaria</i>	2	4,35%
<i>Serratia odorifera</i>	2	4,35%
<i>Cedecea lapagei</i>	1	2,17%
<i>Citrobacter diversus</i>	1	2,17%
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	1	2,17%
<i>Enterobacter</i> spp	1	2,17%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	2,17%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	2,17%
<i>Erwinia stewartii</i>	1	2,17%
<i>Hafnia alvei</i>	1	2,17%
<i>Morganella morganii</i>	1	2,17%
<i>Salmonella</i> spp	1	2,17%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	2,17%
<i>Serratia marcescens</i>	1	2,17%
<b>TOTAL</b>	<b>46</b>	<b>100%</b>

**Tabela 13.** Frequência de enterobactérias verificadas no trato digestório abdominal das moscas coletadas nos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ.

<b>AGENTE</b>	<b>N</b>	<b>FREQÜÊNCIA</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	20,00%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	7	17,50%
<i>Escherichia coli</i>	7	17,50%
<i>Salmonella spp</i>	3	7,50%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	2	5,00%
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	2	5,00%
<i>Hafnia alvei</i>	2	5,00%
<i>Cedecea lapagei</i>	1	2,50%
<i>Citrobacter diversus</i>	1	2,50%
<i>Proteus vulgaris</i>	1	2,50%
<i>Erwinia quercina</i>	1	2,50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2,50%
<i>Proteus spp</i>	1	2,50%
<i>Serratia entomophila</i>	1	2,50%
<i>Serratia odorifera</i>	1	2,50%
<i>Shigella spp</i>	1	2,50%
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>100%</b>

#### 4.3.1 Microbiota enterobacteriana em *Stomoxys calcitrans* no município de Resende

Foi observada uma média de 31,33 (S=10,40) colônias por segmento avaliado, onde a superfície externa das moscas coletadas nas propriedades rurais visitadas no município Resende, foi o segmento com o maior número de colônias e também com o maior número de diferentes espécies de enterobactérias, sendo mais freqüente *E. coli* (32,56%), seguida por *Salmonella spp* (13,95%) e *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* e *Klebsiella oxytoca* (6,98%) cada.

O segundo segmento com maior número de colônias e de espécies identificadas foi o aparelho bucal. Neste segmento foram verificadas 28 colônias que representavam 12 diferentes espécies. As três espécies mais freqüentes foram *E. coli* (32,14%), seguida por *Enterobacter agglomerans* (14,29%) e *Shigella spp* (10,71%).

O segmento com menor número de colônias e espécies identificadas, foi o trato digestório abdominal. Nesta região foram observadas 23 colônias, que representavam 10 diferentes espécies de enterobactérias, sendo que as três mais freqüentes foram: *E. coli* (26,09%); *Enterobacter agglomerans* (21,74%); e *Enterobacter cloacae* (17,39%).

#### 4.3.2 Microbiota enterobacteriana em *Stomoxys calcitrans* no município de Barra Mansa

De acordo com os dados obtidos, os segmentos avaliados neste município, obtiveram uma média de 21,66 (S=7,23) colônias. A distribuição da freqüência de enterobactérias nos segmentos foi semelhante à observada no município de Resende, onde a superfície externa foi o segmento com maior quantidade de colônias e de espécies identificadas, seguida pelo aparelho bucal e tubo digestivo abdominal das moscas coletadas, ambas com o mesmo número de espécies isoladas.

Na superfície externa foram isoladas 30 colônias, relacionadas com 13 diferentes espécies. Neste segmento as três espécies mais frequentes foram *E. coli* (30%), *Enterobacter agglomerans* (16,67%); *Enterobacter cloacae* e *Salmonella* spp. (10%) cada espécie.

Foi verificado o mesmo número de espécies identificadas (11) no aparelho bucal e o trato digestório abdominal das moscas coletadas nas fazendas visitadas de Barra Mansa. No entanto, foram isoladas 18 colônias no segmento aparelho bucal, enquanto que no trato digestório abdominal, foram isoladas 17 colônias.

No aparelho bucal, a espécie mais frequente foi *E. coli* (27,78%), seguida por *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia ficaria* (11,11%) cada espécie. Enquanto que no trato digestório abdominal, a espécie mais frequente foi *E. cloacae* (23,53%), *Enterobacter amnigenus* (17,65%) e *E. agglomerans* (11,76%).

#### 4.4 Observações da Microbiota Enterobacteriana Identificada

De acordo com os resultados obtidos, foi verificado um total de 28 diferentes espécies enterobacterianas. Dentre elas, algumas se destacam pelo seu alto potencial patogênico (KONEMAN et al., 2001), apesar de não terem sido realizadas estudos acerca de sua patogenicidade no presente estudo. A espécie *Escherichia coli*, dependendo da linhagem é capaz de produzir um grande número de enfermidades em humanos e animais, como distúrbios gastroentéricos, urinários, mastite, dentre outras. Esta espécie já foi anteriormente descrita em *S. calcitrans* por diversos autores (CASTRO et al., 2001; ROCHON et al., 2005; FÖRSTER et al., 2007; CASTRO et al., 2007).

No presente estudo, 52,27% das amostras de *E. coli* identificadas foram isoladas da superfície externa das moscas coletadas, 31,82% do aparelho bucal e 15,91% do trato digestório abdominal. Em algumas situações este agente foi isolado em mais de um segmento de uma mesma mosca, como observado na Propriedade 8, em que o agente foi isolado nos três segmentos estudados de uma mesma mosca. De acordo com os resultados, a taxa de infecção de *S. calcitrans* por *E. coli* foi de 19,5% (N=39). Este fato possivelmente se deve à frequente presença deste agente em locais onde todas as formas evolutivas da mosca dos estábulos se fazem presente.

De acordo com Rochon et al. (2004; 2005), *E. coli* parece ter um papel importante no desenvolvimento das fases não parasitárias da mosca dos estábulos. De acordo com os autores, em criações laboratoriais da mosca dos estábulos, meios enriquecidos com *E. coli* apresentaram um maior número de adultos emergidos do que naquelas gaiolas entomológicas, sem meios enriquecidos com *E. coli*. Os mesmos autores relataram que as moscas emergidas possuíam o agente em seu tubo digestivo e que o mesmo permanecia vivo. Ainda segundo os referidos autores, *E. coli* faz parte da microbiota das formas imaturas da mosca dos estábulos, favorecendo o desenvolvimento destas formas. Esta observação destaca o papel das moscas como disseminadora de *E. coli* para o ambiente.

Outro agente verificado no estudo, *E. agglomerans* já foi anteriormente isolado na mosca dos estábulos como relatado por Castro et al. (2007), sendo também isolado por outros autores em outras moscas (MARCHINI et al., 2002). Algumas estirpes deste agente possuem potencial patogênico principalmente para plantas, podendo também acometer homens e animais imunodeprimidos (GONÇALVES et al., 2000).

A espécie *E. cloacae* observada no presente estudo já foi relatada por Castro et al. (2007) em seu estudo realizado na mesma microrregião. Oliveira et al. (2000) destacaram que o referido agente tem sido descrito como causador de doenças nosocomiais e presentes surtos de infecções hospitalares, apesar de fazer parte da microbiota indígena do tubo digestivo de aves (MENEZES et al., 2005). Neste estudo o referido agente foi observado em 18 (11,32%) das 159 colônias isoladas.

O gênero *Salmonella*, observado em 7,55% dos isolados recebe grande destaque na literatura como agente com grande potencial patogênico (SANTOS et al., 2000; LEE; LEE, 2007). Este gênero foi isolado nos três segmentos avaliados, porém com maior frequência (83,33%) na superfície externa. Outros autores também o isolaram em *Musca domestica* e em *S. calcitrans* sem descrever as alterações fisiológicas causadas (STORK, 1979; CASTRO, et al., 2007; VANSELOW et al., 2007).

Outro agente com destacado potencial patogênico, *Shigella* spp, foi observado em 7,4% do total de colônias isoladas. Este agente é tido como potencial causador de enfermidades gastroentéricas, síndromes urêmicas e septicemia (PENATTI et al., 2007; GAYNOR et al., 2008). No presente estudo, este agente ao contrário do observado com *Salmonella* spp, foi mais freqüente (57,14%) no aparelho bucal das moscas coletadas, apesar de ter sido também isolado na superfície externa e no trato digestório abdominal.

*Shigella* spp já havia sido observada por Castro et al. (2007) na mosca dos estábulos do referido estudo. No entanto, alguns autores já haviam descrito o agente em outros muscídeos (ECHEVERRIA et al., 1983; LEVINE, LEVINE, 1991; KHALIL et al., 1994), sendo assim, foi demonstrado que as moscas têm importante papel na disseminação deste agente. Sendo necessário um maior cuidado sanitários nas propriedades a fim de se evitar enfermidades, principalmente as gastroentéricas, causadas por esta bactéria.

Outro agente observado no estudo, que também é descrito como potencial patógeno, a espécie *Enterobacter amnigenus*, que foi identificada em cinco colônias, sendo observado principalmente no trato digestório abdominal das moscas. Esta bactéria já foi isolada em casos de mastite bacteriana bovina, infecções hospitalares, sendo considerada muitas vezes como um agente oportunista (CAPDEVILA et al., 1998; KAGKIL et al., 2007; KORAH et al., 2007). De acordo com a literatura, esta foi a primeira oportunidade em que *E. amnigenus* foi isolado em *S. calcitrans*. Até então este agente havia sido relatado anteriormente no intestino de larvas de mosquitos do gênero *Anopheles* spp (KHAMPANG et al., 1999).

A espécie *Klebsiella oxytoca* foi verificada no presente estudo em 3,14% das colônias isoladas, sendo observada na superfície externa (80%) e no tubo digestivo dissecado (20%). Este agente já foi isolado em casos de mastite bacteriana bovina, otite média, colites hemorrágica dentre outros (BERTHELOT et al., 2001). Esta bactéria já havia sido descrito em *S. calcitrans* anteriormente por Castro et al. (2007). Em outras moscas sinantrópicas, este agente foi relatado por Sulaiman et al. (2000).

Outro agente verificado em cinco colônias foi *Serratia odorifera*, que é um agente comensal observado em plantas e alimentos, porém com relatos de causar pneumonia, infecções urinárias e septicemia em humanos (MENEZES et al., 2004; LEE et al., 2006). No presente estudo, este agente foi isolado nos três segmentos estudados, sendo a Propriedade 6 com o maior número de isolamentos (3). Esta espécie ainda não havia sido isolada em *S. calcitrans*, apesar de ter sido observada no estudo de Perrucci e Rossi (2002) em *Psoroptes cuniculi*, onde o agente foi isolado da superfície externa do ácaro.

Foram identificadas quatro colônias de *Edwardsiella ictaluri* em duas propriedades do município de Resende, sendo descrita como patogênica em criações de peixes de água doce, onde causa septicemia entérica e morte dos peixes, sem muita importância em saúde humana e para animais domésticos (MCGINNIS et al., 2003). No presente estudo, o agente foi isolado duas vezes na superfície externa da mosca dos estábulos e duas vezes no trato intestinal abdominal. O isolamento deste agente nas moscas coletadas possivelmente se deve a presença de pisciculturas próximas às propriedades visitadas.

A espécie *Morganella morganii* é encontrado comumente no trato intestinal de homens e animais e foi descrito como causador de infecções urinárias e oculares, mas sempre sendo relacionado a infecções hospitalares (FALAGAS et al., 2006). No presente estudo, esta enterobactéria foi isolada da superfície externa e no aparelho bucal em quatro moscas

distintas. Este agente foi descrito no intestino da larva do díptero *Helaeomyia petrolei*, onde Kadavy et al. (2000) descreveram o agente em macerado destas moscas. No entanto, nenhum relato desta espécie em mosca dos estábulos havia sido verificado.

*Proteus mirabilis* foi identificado em quatro moscas distintas, sendo que em duas em suas superfícies externas e outras duas no aparelho bucal. No que se refere ao seu potencial patogênico, esta espécie é descrita causando infecções urinárias, gastro-entéricas e septicemia e pneumonias em pacientes imunocomprometidos (COHN et al., 2003). Este agente já havia sido descrito na mosca dos estábulos por Greenberg e Klowden (1972) e Castro et al. (2007), bem como por outros autores em outras moscas como *Lucilla cuprina*, *Dermatobia hominis*, *Cochliomyia hominivorax*, dentre outras (ERDMANN et al., 1986; SANCHO et al., 1996; MORRIS et al., 1997).

*Cedecea lapagei*, outro agente isolado no estudo não possui potencial patogênico, como citado por Koneman et al. (2001). Existem poucos relatos na literatura acerca desta espécie. Brum e Teixeira (1999) relataram alterações patológicas em teleógenas de *Boophilus microplus*, em estudos de controle biológico deste ácaro. Hernández et al. (2003) descreveram um caso na Costa Rica de paciente humano com ventriculite causada por este agente. Davis e Wall (2006) relataram caso de peritonite em paciente humano pós-transplante hepático. Nenhum infecção por *C. lapagei* em animais havia sido descrito na literatura. No presente estudo, *C. lapagei* foi observado nos três segmentos estudados de três moscas distintas.

A espécie *Citrobacter diversus*, observada em três isolamentos, foi observada uma vez em cada segmento avaliado. Este agente é relatado como causador de enteropatias em humanos e animais e em meningites em humanos neonatos (SORIANO et al., 1991; KONEMAN et al., 2001). No entanto, este agente é tido como um contaminante ambiental, estando presente em solos, fezes de aves e mamíferos, dentre outros locais (KONEMAN et al., 2001). Os únicos relatos desta espécie em muscídeos foram o de Oliveira et al. (2006), que observaram este agente na superfície externa de *M. domestica*; e de Castro et al. (2007) que verificaram o referido agente no aparelho bucal e trato digestório da mosca dos estábulos.

Em outros três isolamentos foi verificada a espécie *Enterobacter aerogenes*. No entanto, este agente só foi observado na superfície externa das moscas coletadas. De acordo com Brooks et al. (2000), este agente é usualmente encontrado no trato intestinal do homem e de outros mamíferos, não sendo patogênico em indivíduos saudáveis. No entanto, de acordo com outros autores o referido agente já foi observado em infecções nosocomiais, infecções respiratórias e urinárias (KONEMAN et al., 2001). Este agente já foi isolado de alguns outros dípteros como *Lutzomyia longipalpis*, *M. domestica* dentre outros (OLIVEIRA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2003; FÖRSTERS et al., 2007).

A espécie *Enterobacter sakazakii* foi isolado em duas oportunidades na superfície externa e uma vez no aparelho bucal de moscas coletadas. Ray et al. (2007) descreveram o agente como sendo um importante patógeno para crianças e neonatos. São comuns os estudos de *E. sakazakii* em leite e produtos em pó para crianças devido a sua termorresistência (RAY et al., 2007; ASAKURA et al., 2007). Em medicina veterinária, este agente já foi destacado como agente causador de mastite bovina (BREEUWER et al., 2003).

*Hafnia alvei* foi identificado neste estudo em três moscas distintas, sendo que em duas ocasiões o agente foi isolado do trato digestório abdominal e uma no aparelho bucal. Este agente faz parte da microbiota indígena do intestino de mamíferos e não tem grande potencial patogênico, apesar de ter sido citado na literatura como um potencial causador de mastite bovina (JANDA; ABBOTT, 2006). Este agente já foi isolado em muscídeos, abelhas e coleópteros (NASCIMENTO et al., 2003; JANDA; ABBOTT, 2006; LUNDGREN et al., 2007).

Dentre as espécies observadas apenas em dois isolamentos, duas são citadas como tendo potencial entomopatogênico como *Serratia entomophila* e *S. marcescens* (GRIMONT;

GRIMONT 1978). O'Callaghan et al. (1996) descreveram o potencial patogênico destas espécies em *Lucilia sericata*. No que se refere ao isolamento deste agente em *S. calcitrans*, Castro et al. (2007) observaram *S. marcescens* em macerado de moscas coletadas em um município vizinho aos visitados neste estudo. *Serratia marcescens* foi isolado, no presente estudo, no aparelho bucal e na superfície externa de duas moscas distintas. Romero et al. (2006) verificaram em seu estudo que as formas imaturas da mosca dos estábulos se desenvolveram melhor em um meio com *S. marcescens* do que em um meio estéril, destacando sua importância no desenvolvimento da mosca dos estábulos, visto que as formas imaturas dependem deste agente no ambiente para seu desenvolvimento. No presente estudo, *S. entomophila* foi observado na superfície externa e no trato digestório abdominal.

Dentre os agentes verificados em apenas um isolamento, apenas *Proteus vulgaris* tem potencial patogênico. Brooks et al. (2000) relatam que o referido agente faz parte da microbiota normal de humanos e animais, solo e carnes cruas, porém pode ser isolado em infecções urinárias, entéricas e em feridas cortantes. Este agente já foi verificado em alguns muscídeos como *M. domestica* e *S. calcitrans* (NASCIMENTO et al., 2003; MORAES et al., 2004; CASTRO et al., 2007).

Dos outros agentes observados em apenas um isolamento, todos são considerados agentes ambientais não patogênicos ou oportunistas para humanos e animais. No entanto, estes agentes recebem citação como agentes entomopatogênicos, como é o caso de *Serratia liquefaciens*, ou fito-patógenos como *Erwinia quercina* e *E. stewartii* (DEBOUIX et al., 2005; YOUNG et al., 2007). Nenhuma descrição destes agentes foi realizada em *S. calcitrans*, no entanto, alguns autores os relataram em *M. domestica* e *Lucilia sericata* (O'CALLAGHAN et al., 1996; NAYDUCH et al., 2005).

Algumas espécies observadas no presente estudo não possuem patogenicidade descrita, como *Edwardsiella hoshinae* e *Kluyvera* spp (JANDA et al., 1991; CARTER; EVANS, 2005), de acordo com estes autores estas espécies são comumente encontradas em diversos ambientes.

De uma forma geral, uma grande parte das espécies identificadas neste estudo faz parte da microbiota indígena do tubo digestivo de alguns mamíferos, aves, ou são agentes que são comumente observados no ambiente. Por outro lado, algumas espécies também possuem potencial para causar enfermidades em humanos, animais, plantas e insetos, apesar de também serem observados na natureza. Desta forma, a mosca dos estábulos teria potencial de veicular estes agentes em decorrência dos hábitos biológicos das formas não parasitárias e dos adultos ou simplesmente pelo contato com estes agentes no ambiente ou nos indivíduos parasitadas. Outro fato observado neste estudo foi o isolamento de alguns agentes bacterianos nos três segmentos avaliados, destacando assim, o papel da mosca dos estábulos como potencial vetor para algumas espécies de bactérias.

#### **4.5 Associação das Enterobactérias Identificadas nas Moscas Coletadas e no Leite com Mastite.**

De acordo com os resultados obtidos, a única coincidência entre a microbiota de leite e de moscas foi da espécie *E. coli*, sendo verificada esta associação nas Propriedades 1, 2, 3 4, 7, 9 e 10, um total de 58 colônias de *E. coli*. Nenhuma outra espécie enterobacteriana foi observada simultaneamente na mosca dos estábulos ou nas amostras de leite coletadas de uma mesma propriedade. Isto possivelmente se deve ao fato de *E. coli* ser a espécie enterobacteriana mais importante na mastite bacteriana bovina, como destacado em diversos estudos (TODHUNTER et al., 1990; LEHTOLAINEN, 2004).

A observação de *E. coli* como sendo a única espécie isolada tanto em leite como em mosca pode ser explicada pelo fato de ser o agente bacteriano mais comumente presente em episódios de mastite ambiental bovina.

#### **4.6. Avaliação da Variabilidade Genética das Amostras de *Escherichia coli* Isoladas.**

Para a realização desta etapa do estudo, foram analisados seis iniciadores randômicos (M13, 1247, 1254, 1253, 1281 e A04) anteriormente utilizados em estudos populacionais de *E. coli* (PACHECO et al., 1997; GRIF et al., 1998; REGUA-MANGIA et al., 2004). Após uma reação para teste dos iniciadores, três destes iniciadores foram selecionados para a análise de Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD) devido aos perfis apresentarem poder discriminatório, maior número de bandas, intensidade e alta reprodutibilidade das bandas, sendo eles os iniciadores A04, 1254 e M13.

Os iniciadores 1247, 1253 e 1281 não se mostraram apropriados para a investigação da variabilidade genética, apresentando um baixo poder discriminatório, baixo poder de tipagem, fornecendo produtos de amplificação compostos por um número reduzido de bandas ou mesmo não detectáveis.

Após o processo de reação de RAPD-PCR e eletroforese em gel de agarose, os perfis das amostras foram definidos pela intensidade, presença e ausência de bandas. Sendo considerados diferentes quando, pelo menos, uma banda polimórfica era detectada. Desta forma, os perfis foram analisados de acordo com os três iniciadores utilizados. A Figura 19 ilustra os perfis eletroforéticos obtidos com os iniciadores selecionados de amostras de *E. coli* (Propriedades 1, 2 e 3).

Após análise visual e automatizada (*UVIPro bandmap* versão 11.9) os perfis foram organizados de acordo com a diversidade genética e relações de clonalidade entre subpopulações bacterianas de *E. coli*.

As reações de amplificação geraram perfis que variaram de quatro a 21 bandas. O iniciador A 04 gerou perfis que variaram de cinco a 19 bandas, enquanto que o iniciador 1254 apresentou perfis de quatro até 17 bandas e por fim, os perfis gerados pelo iniciador M13 variaram de sete a 21 bandas.

No que se refere ao peso máximo e mínimo das bandas, os iniciadores geraram bandas de aproximadamente 320 bp até 3500 bp. Não houve correlação entre o conteúdo de C + G dos iniciadores e a capacidade de detectar perfis polimórficos. As reações com os “primers” A04 (60%), 1254 (70%) e M13 (66%) geraram respectivamente 49, 49 e 50 perfis distintos (Tabela 15).

De acordo com os resultados obtidos, o RAPD-PCR foi capaz de realizar a tipificação de todas as amostras em teste, visto que todas as amostras de *E. coli* apresentaram bandas nas reações em que se utilizaram os três iniciadores testados. Sendo assim, o RAPD-PCR demonstrou possuir efetivo poder discriminatório em relação à *E. coli*.

Foram observadas similaridade entre os perfis eletroforéticos entre alguns isolados (Tabela 14). As amostras geneticamente mais relacionadas foram identificadas dos casos de mastite bacteriana bovina. Os grupos clonais 1.02 e 1.03 representam *E. coli* isoladas na Propriedade 1, de duas vacas distintas, o mesmo ocorrendo com a amostra 4.22 que mostrou perfil eletroforético idêntico das amostras 4.20 e 4.21, que foram isoladas de quartos mamários diferentes de uma mesma vaca. Além destas amostras, foi observada similaridade entre as amostras 7.31 e 7.32 (P7); 9.42 e 9.43 (P9). Estas amostras também foram isoladas a partir de quartos mamários distintos de uma mesma vaca.

A observação de padrões eletroforéticos iguais entre si de amostras bacterianas isoladas de vacas de uma mesma propriedade sugere a disseminação do referido agente

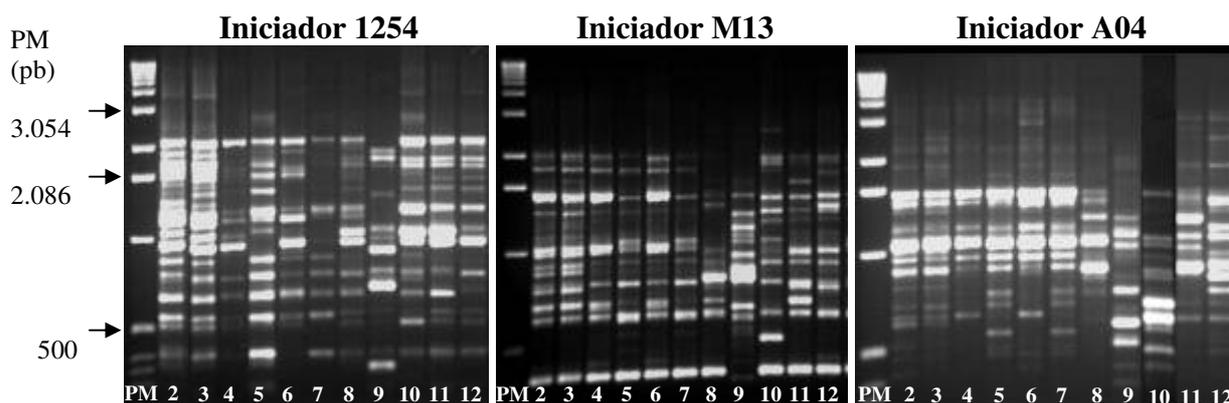
bacteriano no rebanho, fato que possivelmente pode ser explicado pelo precário nível higiênico-sanitário nas fazendas visitadas. Nestas propriedades era comumente observada a falta de cuidados na ordenha, não sendo realizada rotina de limpeza prévia dos tetos e lavagem das mãos dos ordenhadores, o que favorecia a veiculação de agentes. Também não foi verificada a adoção da estratégia de oferecimento de alimento pós-ordenha com o objetivo de evitar que os animais se deitem, antes que haja o fechamento do canal galactóforo, dificultando a ascensão de agentes causadores de mastite aos quartos mamários.

**Tabela 14.** Amostras de *Escherichia coli* identificadas de leite com mastite e das moscas coletadas nas propriedades rurais visitadas dos municípios de Barra Mansa e Resende, RJ. (Continua).

Amostra	Propriedade	Fonte		Local	Perfis eletroforéticos		
		Vaca	Mosca		1254	A04	M13
2	I	3		Posterior Esquerdo	1	1	1
3	I	5		Anterior Direito	1	1	1
4	I		4	Superfície Externa	2	2	2
5	I		18	Superfície Externa	3	3	3
6	II	12		Posterior Esquerdo	4	4	4
7	II		3	Superfície Externa	5	5	5
8	II		9	Superfície Externa	6	6	6
9	II		16	Aparelho Bucal	7	7	7
10	III	16		Posterior Direito	8	8	8
11	III		10	Superfície Externa	9	9	9
12	III		12	Superfície Externa	10	10	10
13	V		2	Aparelho Bucal	11	11	11
14	V		13	Superfície Externa	12	12	12
15	V		13	Aparelho Bucal	13	13	13
16	V		19	Trato Digestório Abdominal	13	13	13
17	V		19	Aparelho Bucal	14	14	14
19	IV	24		Anterior Direito	15	15	15
20	IV	24		Posterior Direito	16	16	16
21	IV	26		Posterior Esquerdo	16	16	16
22	IV	27		Anterior Esquerdo	16	16	16
23	IV	28		Posterior Direito	17	17	17
24	IV		1	Superfície Externa	18	18	18
25	IV		8	Aparelho Bucal	19	19	19
26	IV		16	Superfície Externa	20	20	20
28	VI		2	Trato Digestório Abdominal	21	21	21
29	VI		7	Trato Digestório Abdominal	22	22	22
30	VI		14	Superfície Externa	23	23	23
31	VII	37		Anterior Direito	24	24	24
32	VII	37		Posterior Esquerdo	24	24	24
33	VII		10	Superfície Externa	25	25	25
34	VII		12	Aparelho Bucal	26	26	26
35	VII		14	Superfície Externa	27	27	27
36	VII		19	Aparelho Bucal	28	28	28
37	VII		19	Superfície Externa	28	28	29
38	VIII		14	Superfície Externa	29	29	30
39	VIII		14	Aparelho Bucal	29	30	31
40	VIII		14	Trato Digestório Abdominal	30	30	31
41	VIII		20	Superfície Externa	30	30	31
42	IX	43		Anterior Esquerdo	31	31	32
43	IX	43		Anterior Direito	31	31	32
44	IX		4	Superfície Externa	32	32	33
45	IX		14	Aparelho Bucal	33	33	34
46	IX		20	Aparelho Bucal	34	34	35

**Tabela 14.** Continuação

Amostra	Propriedade	Fonte		Local	Perfis eletroforéticos		
		Vaca	Mosca		1254	A04	M13
48	1X	49		Anterior Esquerdo	35	35	36
49	X		2	Trato Digestório Abdominal	36	36	37
50	X		3	Aparelho Bucal	37	37	38
51	X		5	Superfície Externa	38	38	39
52	X		6	Aparelho Bucal	39	39	40
53	X		7	Aparelho Bucal	40	40	41
54	X		7	Trato Digestório Abdominal	41	41	42
55	X		9	Aparelho Bucal	42	42	43
56	X		10	Superfície Externa	43	43	44
57	X		11	Superfície Externa	44	44	45
58	X		13	Superfície Externa	45	45	46
59	X		15	Superfície Externa	46	46	47
60	X		17	Superfície Externa	47	47	48
61	X		19	Trato Digestório Abdominal	48	48	49
62	X		20	Superfície Externa	49	49	50



**Figura 19.** Perfis eletroforéticos de amostras de *Escherichia coli* identificadas no estudo, obtidos pelos iniciadores 1254, M13 e A04 pela Amplificação Randômica de DNA Polimórfica (RAPD-PCR); onde PM se localiza o peso molecular de 1 Kb; colunas 2-5 amostras coletadas na Propriedade 1; colunas 6-9 amostras da Propriedade 2; colunas 10-12 amostras Propriedade 3. No lado esquerdo, peso dos fragmentos do Peso Molecular.

Também foram observados perfis eletroforéticos iguais entre si em amostras isoladas de diferentes segmentos de uma mesma de moscas e de moscas distintas Tabela 14.

Apenas ao utilizar o iniciador 1254, foi possível obter perfis eletroforéticos iguais entre si de isolados de moscas distintas, onde neste caso, as colônias foram isoladas da superfície externa. Isto possivelmente se deve a presença do agente nos ambientes utilizados pela mosca dos estábulos para o desenvolvimento de suas formas não parasitárias.

As Figuras 20, 21 e 22 representam os dendrogramas obtidos com os iniciadores 1254, A04 e M13, fazendo referência à tabela 14. Os referidos dendrogramas foram obtidos com base na análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (Coeficiente de Jaccard) por RAPD entre os as amostras de *E. coli* isoladas dos segmentos da mosca dos estábulos e leite com mastite.

De acordo com os resultados, foi verificado que, dentre as amostras de *E. coli* obtidas de leite, todas que possuíam perfis eletroforéticos iguais entre si eram provenientes de propriedades rurais que compartilhavam determinadas características, tais como ordenha manual, manejo higiênico-sanitário precário e na maioria das vezes a ordenha era realizada em currais com piso de terra batida. Desta forma, os resultados sugerem que ambientes e manejos de ordenha com níveis precários de higiene predispõe à disseminação de agentes entre os animais do rebanho.

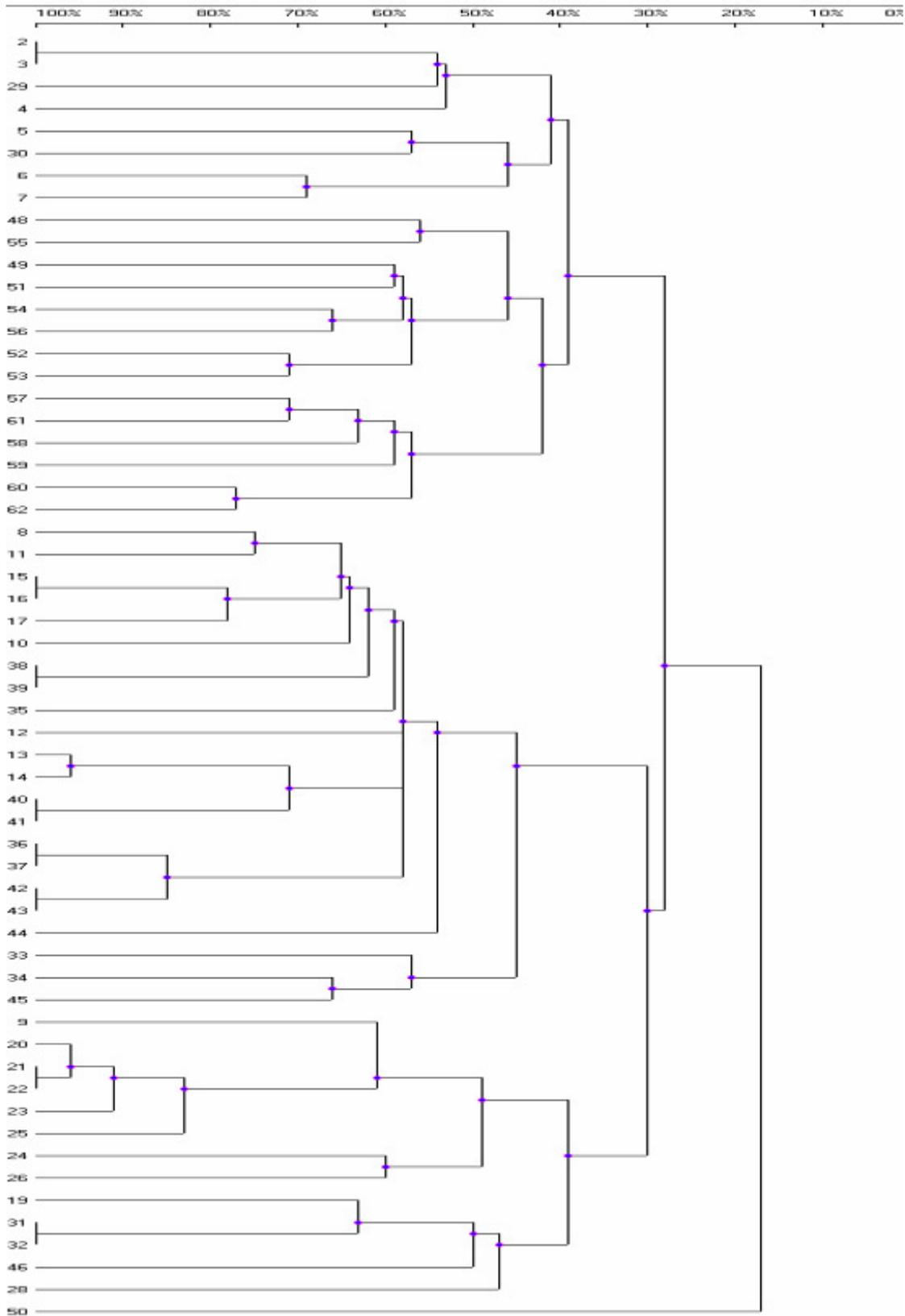
Por outro lado, alguns outros fatores não influenciaram na distribuição do perfil eletroforético, tais como presença de substratos que favorecem o desenvolvimento da mosca dos estábulos; suplementação alimentar pós-ordenha e atipia bioquímica.

Com relação aos perfis eletroforéticos verificados, foi observado que amostras obtidas de casos de mastite sub-clínica eram geneticamente mais relacionadas comparado com a única amostra de mastite clínica causada por *E. coli*, sugerindo assim, uma diferença genética dentre as *E. coli* causadoras de mastite clínica e sub-clínica (Figura 23).

No que se refere às amostras obtidas de segmentos da mosca dos estábulos, foi verificada uma grande diversidade de perfis eletroforéticos, sugerindo que tratavam-se de amostras adquiridas do ambiente, e não de situações patogênicas, visto que as amostras geneticamente mais relacionadas foram detectadas em propriedades rurais sem nenhuma característica especial, apenas fazendas sem um manejo higiênico-sanitário ideal.

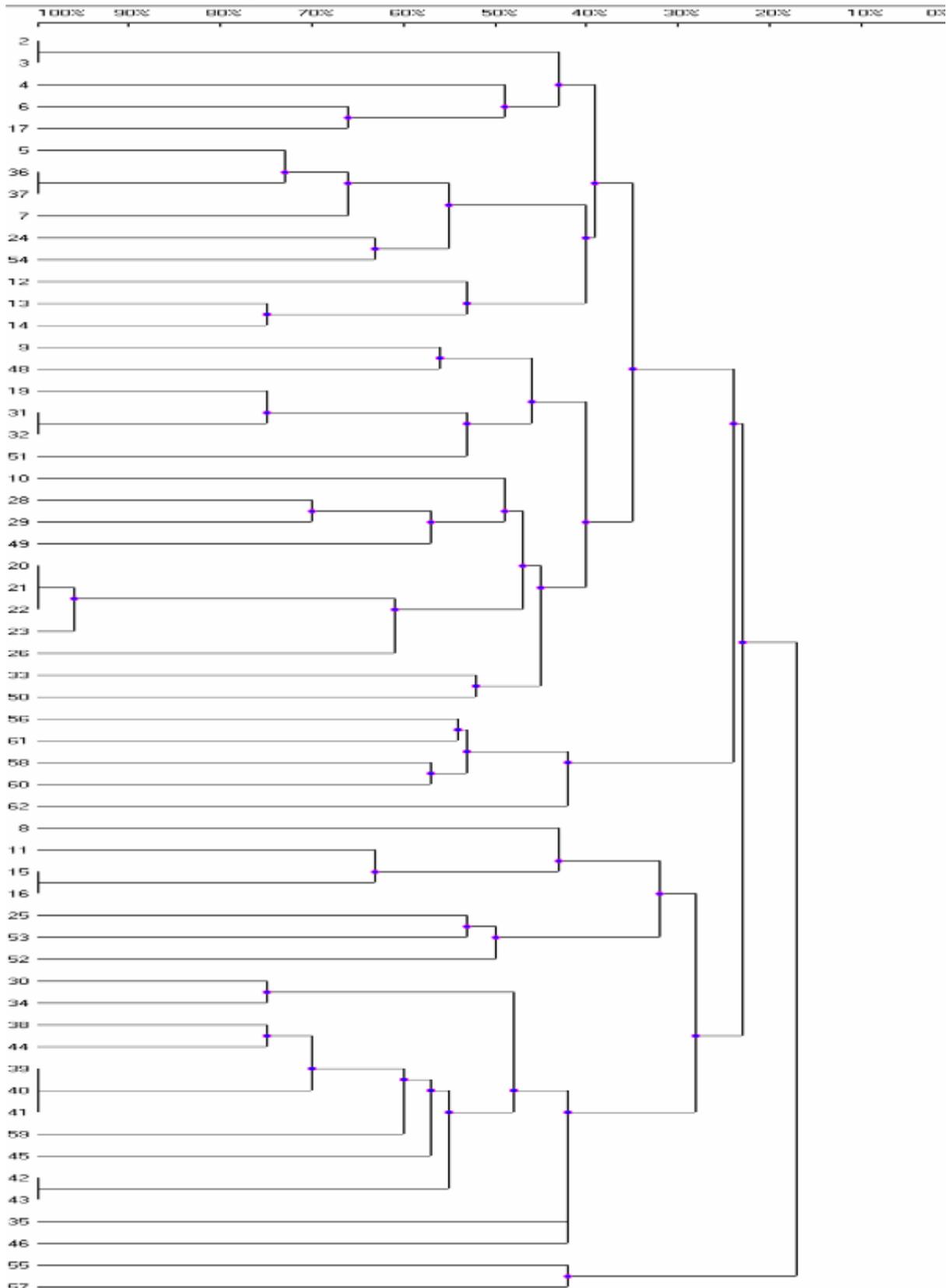
De acordo com os resultados, a diversidade genética detectada na população estudada, sugere que as amostras de *E. coli*, isoladas de amostras de leite com mastite e de segmentos da

Dendrograma com coeficiente de homologia 1,0% (UPGMA)



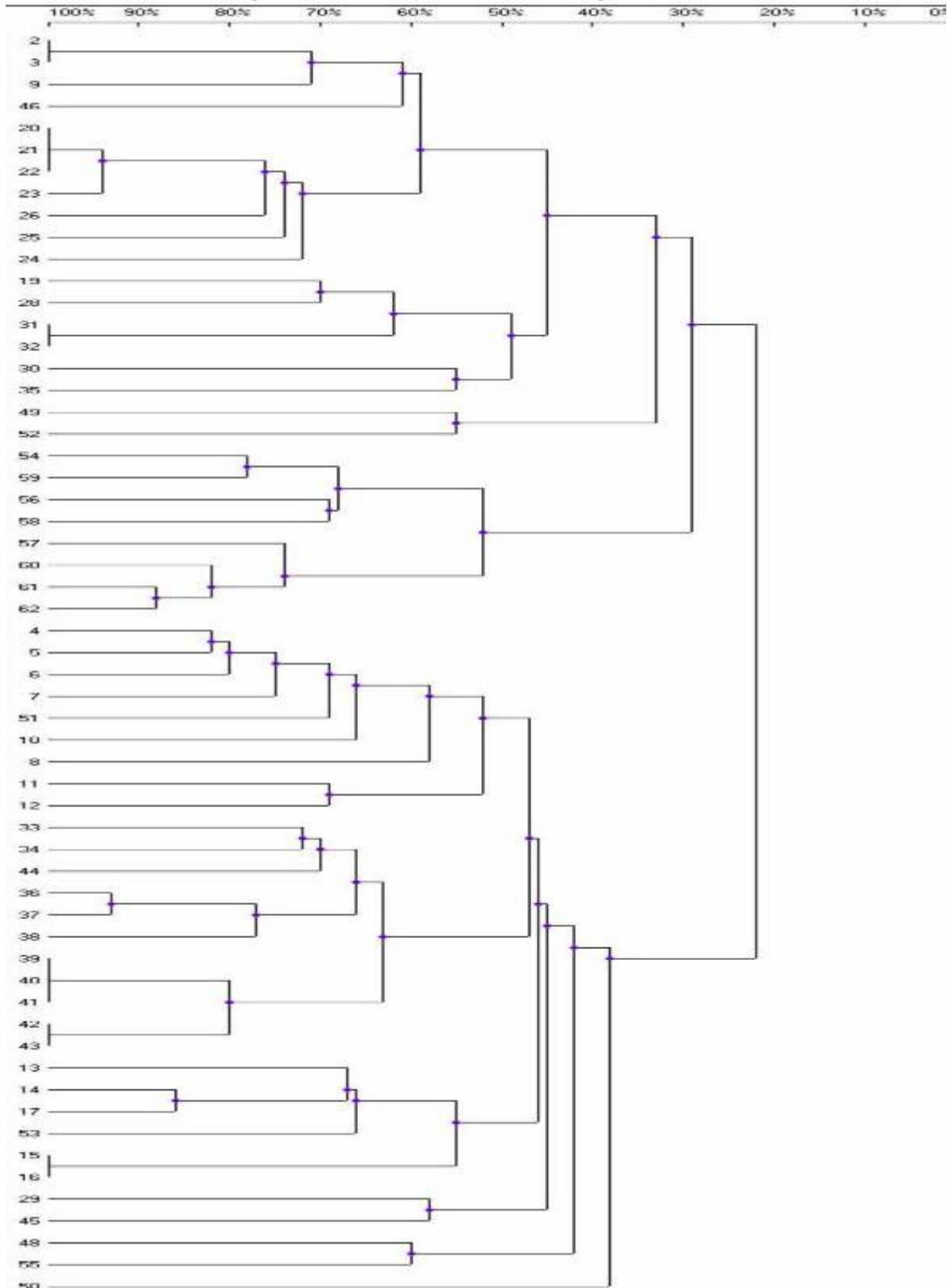
**Figura 20.** Dendrograma gerado pelo iniciador 1254 das amostras de *Escherichia coli* isoladas de amostras de mosca dos estábulos e de leite com mastite.

Dendrograma com coeficiente de homologia 1,0% (UPGMA)

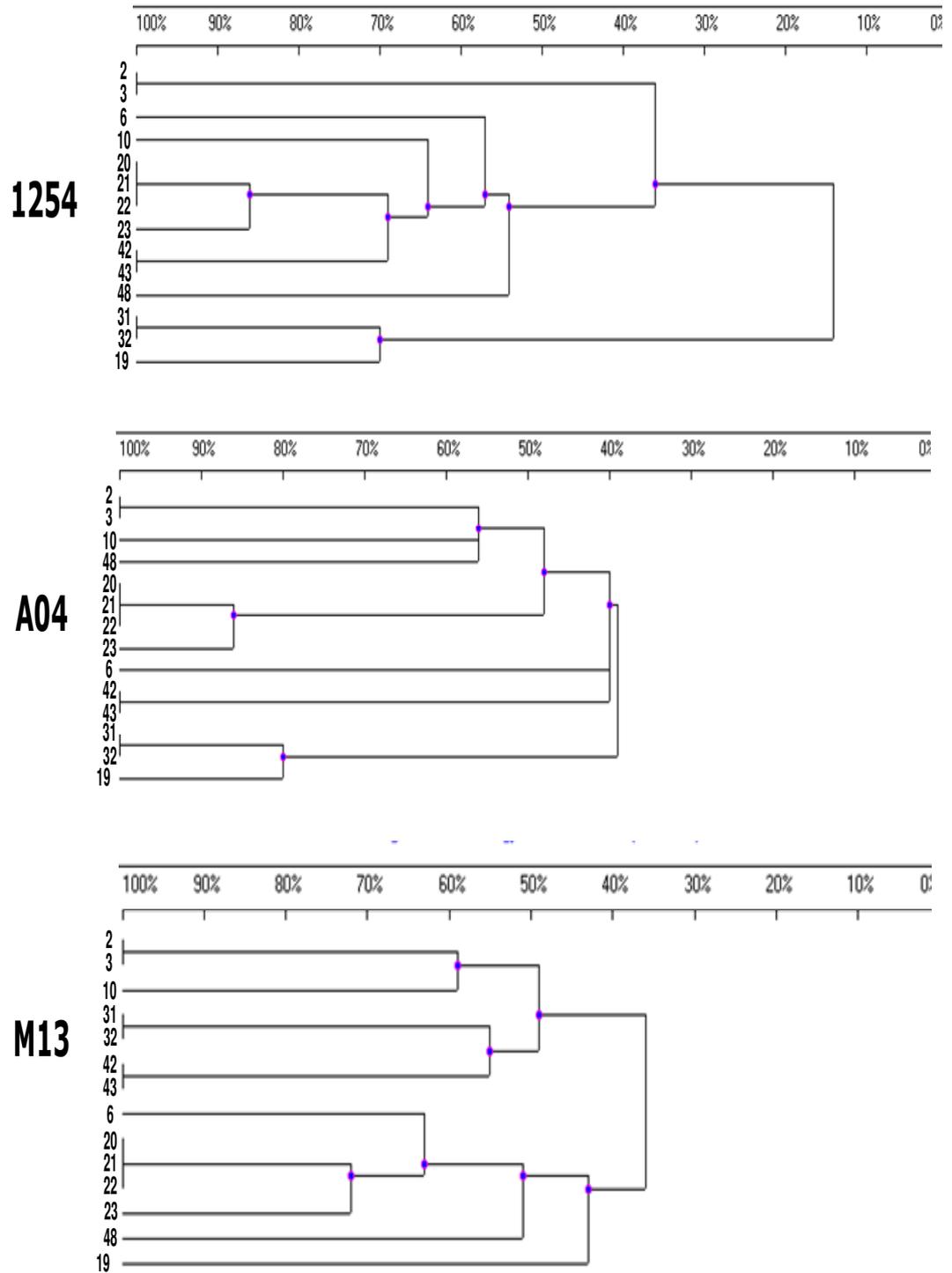


**Figura 21.** Dendrograma gerado pelo iniciador A04 das amostras de *Escherichia coli* isoladas de amostras de mosca dos estábulo e de leite com mastite.

Dendrograma com coeficiente de homologia 1,0% (UPGMA)



**Figura 22.** Dendrograma gerado pelo iniciador M13 das amostras de *Escherichia coli* isoladas de amostras de mosca dos estábulos e de leite com mastite.



**Figura 23.** Dendrograma das amostras de *Escherichia coli* isoladas de leite das propriedades visitadas, frente aos diferentes iniciadores, sendo a amostra 19 a única referente à mastite clínica.

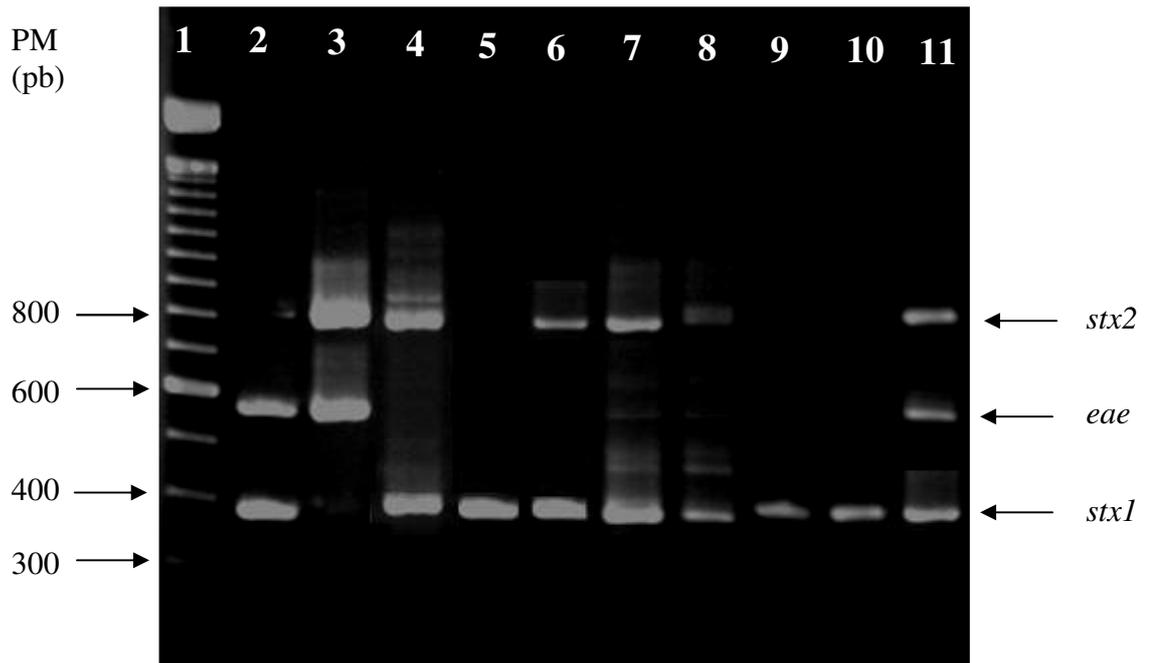
mosca dos estábulos, constituem uma população bacteriana de origem não clonal. Esta diversidade foi esperada, uma vez que dispersos na comunidade, estes microrganismos são submetidos a condições adversas e não a situações epidemiológicas particulares, visto que não houve compartilhamento de perfis eletroforéticos entre as propriedades rurais, e tampouco entre os municípios visitados.

Este é o primeiro estudo em que é feita uma avaliação da correlação entre subpopulações de *E. coli* isoladas de leite com mastite e moscas. Em estudos similares, alguns autores relatavam que os muscídeos eram vetores de determinado agente patogênico quando observava similaridade nos isolados da mosca e do leite. No entanto, não foi realizado nenhum estudo onde ferramentas moleculares eram utilizadas para averiguação da real clonalidade destas subpopulações. Sendo desta forma, premeditado afirmar que a mosca dos estábulos, ou outro muscídeo, foi responsável pela transmissão de algum agente patogênico.

#### **4.7 Incidência de *Escherichia coli* Shiga-Toxigênica (STEC) em *Stomoxys calcitrans* e Leite com Mastite.**

Todos os isolados de *E. coli* foram submetidos à Reação de Polimerase em Cadeia – Multiplex (Multiplex-PCR) para detectar os genes *stx1*, *stx2* e *eae*. Com relação aos casos de mastite causados por *E. coli*, 14,28% eram STEC, enquanto que nas colônias de *E. coli* isoladas das moscas dos estábulos coletadas, 13,63% eram STEC.

Das STEC isoladas do leite, só foram observadas amostras *stx1* positivos. Enquanto que das STEC observadas em *S. calcitrans* uma amostra (16,66%) era *stx1* positiva, quatro (66,66%) eram *stx1* e *stx2* positiva, e apenas uma (16,66%) apresentava os genes *stx 1*, *stx 2* e *eae* (Figura 24).



**Figura 24.** Gel de Agarose com as amostras STEC positivas, onde a coluna 1 representa o Peso Molecular (100 bp); 2: amostra padrão E40705 (*stx1* e *eae* +); 3: amostra padrão E30121 (*stx2* e *eae* +); 4: Amostra 5.14; 5: Amostra 5.17; 6: Amostra 6.28; 7: Amostra 6.29; 8: Amostra 6.30; 9: Amostra 7.31; 10: Amostra 7.32; 11: Amostra 7.40.

Os resultados obtidos nas amostras de leite confirmam o observado por Lira et al. (2004), onde estes autores verificaram uma incidência de 12,08% de STEC nas amostras de leite com mastite cujo agente etiológico era *E. coli*. No entanto, os mesmos autores relataram uma ocorrência maior de genes associados às STEC, onde metade de suas amostras apresentaram o gene *eae*, enquanto que no presente estudo nenhuma das duas amostras apresentaram o referido gene. Este fato pode ser explicado pela maior quantidade de amostras de *E. coli* avaliadas por Lira et al. (2004), pois a taxa de incidência de STEC nas amostras de leite foi similar. As STEC observadas no presente estudo, que foram obtidos de quartos mamários distintos de uma mesma vaca, de acordo com o estudo molecular, são organismos com mesmo perfil eletroforético.

Das seis amostras onde foram detectados os genes de virulência na mosca dos estábulos, 50% destas foram observadas na superfície externa das moscas coletadas, 33,33% do conteúdo intestinal e apenas uma amostra (16,67%) foi isolada do aparelho bucal. Desta forma, pode-se constatar que a mosca dos estábulos tem a capacidade de veicular STEC nos três segmentos avaliados, visto que foram obtidas colônias viáveis da superfície externa, principalmente, do aparelho bucal e do trato digestório abdominal. Keen et al. (2006) já haviam relatado a presença de STEC em diversos muscídeos, inclusive *S. calcitrans*. No entanto, ainda não havia sido descrito a capacidade da referida mosca na veiculação deste tipo de *E. coli* no Brasil.

De acordo com os resultados, foi verificado que a maior parte das amostras carregava o gene *stx2*, fato que aumenta a importância das políticas de vigilância epidemiológica, devido ao seu alto potencial patogênico como descrito por Aktories e Just (2000).

Sendo assim, pode-se destacar a capacidade da mosca dos estábulos na possibilidade de contaminação de alimentos utilizados por homens e animais por este agente, visto que este muscídeo utiliza compostos orgânicos para oviposição, bem como os cochos e baias, para descanso entre as alimentações, utilizadas pelos animais, onde geralmente a mosca defeca.

Outro fato observado neste estudo foi o isolamento de STEC no aparelho bucal de uma das moscas coletadas. Este fato destaca o potencial da mosca dos estábulos na possibilidade de transmissão deste agente ao picar seus hospedeiros, transferindo o agente no momento da picada ou na regurgitação durante a sua alimentação.

Estes resultados são importantes para ressaltar o papel da mosca dos estábulos na veiculação de agentes com grande potencial patogênico e ressaltar a importância no seu controle, a fim de se diminuir a possibilidade de transmissão de *E. coli* diarreiogênicas à população em locais com baixos níveis sanitários, como nas localidades visitadas. Sendo importante ressaltar que as doenças intestinais foram a maior causa de mortes no Brasil em 2005 (MS, 2005).

#### **4.8. Considerações Finais**

De acordo com os resultados observados neste estudo, foi possível verificar que a mastite bacteriana bovina é prevalente em propriedades rurais leiteiras da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, onde a taxa de infecção média foi de 20,63%. Este fato é preocupante, visto que nesta região se concentra a maior bacia leiteira do estado, que abastece de leite o estado do Rio de Janeiro.

Outro ponto de que deve ser destacado foi a resistência antimicrobiana verificada nas espécies isoladas das amostras de leite. Foi verificado que os produtores rurais faziam o tratamento de forma equivocada, muitas vezes usando subdoses de antibióticos e não

observando o tempo correto de administração para o tratamento das vacas. Este fato poderia ser corrigido com assistência médico-veterinária.

A mosca dos estábulos estava presente nos dois municípios visitados, e provavelmente devido a sua similaridade com *M. domestica*, alguns produtores não percebiam a presença de *S. calcitrans* em suas propriedades. Em algumas propriedades esta mosca se fazia presente em grande número em decorrência do uso de substratos que favoreciam seu desenvolvimento e de outras moscas, como cama de frango, palha de café, cevada, dentre outros.

No presente estudo, foram isolados agentes bacterianos potencialmente patogênicos nos três segmentos dos exemplares de *S. calcitrans*, onde se destacam *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Escherichia coli*. No que se refere a *E. coli*, foi verificado nas moscas coletadas a presença de *E. coli* Shiga-Toxigênicas.

Este estudo tem grande importância, principalmente, no que se refere à Vigilância Sanitária de produtos alimentícios, visto que é de certa forma comum o consumo de leite recém ordenhado pelos trabalhadores rurais, bem como a venda informal do leite de algumas das propriedades visitadas em mercados vizinhos a essas fazendas, aumentando a possibilidade de ingestão de agentes patogênicos no consumo destes produtos sem o prévio tratamento térmico.

Em uma das propriedades visitadas, a primeira no município de Resende, foi verificado um manejo higiênico-sanitário correto na ordenha e limpeza constante das instalações. Apesar disso, foi observado acúmulo de palha de café ao lado do curral. Este fato foi relatado ao proprietário que solicitou sua retirada. Na ocasião da entrega do relatório ao produtor, foi verificado que após a retirada da palha de café, o número de moscas nesta fazenda diminuiu consideravelmente.

Neste estudo, foram identificadas espécies bacterianas com potencial entomopatogênico nos três segmentos das moscas avaliadas. Sendo assim, faz-se necessário a realização de estudos sobre o real potencial patogênico destes agentes para *S. calcitrans*, bem como estudos que visem o controle biológico da mosca dos estábulos com o uso destas bactérias entomopatogênicas.

Nas propriedades visitadas dos dois municípios, o apoio técnico era feito de forma precária, onde a maioria destas propriedades não recebia assistência médico-veterinária constante, sendo assistida eventualmente pelos extensionistas da EMATER-RIO. Uma melhor assistência técnica poderia orientar os produtores quanto ao correto manejo higiênico-sanitário nas propriedades, tratamento criterioso dos animais e retirada de substratos que favorecem o desenvolvimento de ecto e endoparasitos; o que auxiliaria os produtores no controle da mastite bovina, como também de outras enfermidades do rebanho, bem como no controle de parasitoses. Com a aplicação destas medidas a produtividade dos rebanhos aumentaria, bem como a renda do produtor rural que cada vez mais seria estimulado a produzir alimentos seguros e de melhor qualidade à população de uma forma geral.

Os resultados obtidos contribuem para o esclarecimento dos aspectos bio-genéticos-epidemiológicos dos patógenos em estudo e são importantes para subsidiar ações de monitoramento e controle destas infecções no âmbito da economia e da saúde pública.

## 5 CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos a partir do estudo da prevalência de mastite bovina e a microbiota bacteriana são compatíveis com investigações prévias em outras regiões do país e são de relevância e aplicabilidade, considerando, a limitação destas informações.
2. A atividade produtora leiteira no rebanho bovino da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense carece de intensificação de melhores práticas de manejo, higiene e profissionalização de pessoal envolvido, por meio de um programa de controle da enfermidade mais eficiente.
3. A mosca dos estábulos possui a capacidade de carrear agentes enterobacterianos nos três segmentos avaliados, sendo a superfície externa o segmento com o maior número de espécies identificadas.
4. A espécie *Escherichia coli* foi a mais freqüente dentre a microbiota identificada nos segmentos avaliados da mosca dos estábulos, sendo a única espécie em que foi observada coincidência de isolamento entre as amostras de leite e de mosca.
5. A investigação das relações de clonalidade entre subpopulações de *E. coli* permitiu detectar uma identidade genética mais estreita entre amostras epidemiologicamente mais relacionadas, sugerindo que a mosca dos estábulos não tem a capacidade de disseminação de *E. coli* causadores de mastite bovina entre propriedades e vacas de um mesmo rebanho.
6. A detecção de amostras de *Escherichia coli* carreadoras dos marcadores genéticos codificadores dos genes *stx* e *eae* a partir do leite com mastite e nos três segmentos da mosca dos estábulos, possibilitou confirmar a potencialidade destes vetores na disseminação agentes bacterianos com reconhecida virulência, circulantes no ambiente, alertando para a necessidade de vigilância sanitária e epidemiológica efetivas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTORIES, K.; JUST, F. *Bacterial Protein Toxins*. Springer, 2000. 7000 p.
- ALMEIDA, L.A.B.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PIRES, M.F.A.; BENITES, N.R. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.1, p.1-6, 2005.
- ANDERSON, J. F.; FROST, W. H. Transmission of poliomyelitis by mean of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*). *Public Health Reports*, v. 27, p. 1733-1735, 1912. apud GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol II: Biology and diseases transmission*. Princeton: Princeton University Press, 1973, 447 p.
- ASAKURA, h.; MAKINO, S.I.; KOBORI, H.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T.; IKEDA, T.; TAKESHI, K. Phylogenetic diversity and similarity of active sites of Shiga toxin (*Stx*) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from humans and animals. *Epidemiology and Infections*, v. 127, p. 27-36, 2001.
- ASAKURA, H.; MORITA-ISHIHARA, T.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. *Microbiology and Immunology*, v. 51, n.7, p. 671-7, 2007.
- BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T.J.G.M.; BEIBOER, M. L.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 411-419, 1998.
- BARNETT, J. L.; COLEMAN, G. J.; HEMSWORTH, P. H.; NEWMAN, E.A.; FEWINGS-HALL, S.; ZIINI, C. Tail docking and beliefs about the practice in the Victorian dairy industry. *Australian Veterinary Journal*. v. 77, n. 11, p. 742-747, 1999.
- BÉJAR, V.; CHUMPITAZ, J.; PAREJA, E.; VALENCIA, E.; HUAMÁN, A.; SEVILLA, C.; TAPIA, M; SAEZ, G. *Musca domestica* como vector mecánico de bactérias enteropatógenas en mercados y basurales de Lima y Callao. *Revista Peruana Medicina Experimental y Salud Publica*, v. 23, n. 1, p. 39-43, 2006.
- BELKUM, A.; STRUELENS, M.; VISSER, A.; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical Microbiology Review*, v. 14, p. 547-560, 2001.
- BERBERIAN, D. A. Sucessfull transmission of cutaneous leishmaniosis by the bites of *Stomoxys calcitrans*. *Proceedings of. Society. Experimental Biology Medicine*, v.38, p. 254 – 256, 1938.

BERKELMAN, R.L. Introduction-demographic and social changes have contributed to the emergence of infectious diseases. In: HORSBURG Jr. R.C.; NELSON, A.M. Pathology of Emerging Infections. Washington, D.C.: ASM, 1997, p. 1-19.

BERRY, E.; BOOTH, J. Summer mastitis in England and Wales: 1992 to 1997. *Veterinary Record*. v. 145, n. 16, p. 469, 1999.

BERTHELOT, P.; GRATARD, F.; PATURAL, H.; ROS, A.; JELASSI-SAOUDIN, H.; POZZETTO, B.; TEYSSIER, G.; LUCHT, F. Nosocomial colonization of premature babies with *Klebsiella oxytoca*: probable role of enteral feeding procedure in transmission and control of the outbreak with the use of gloves. *Infection Control Hospital Epidemiology*, v. 22, n.3, p. 148-151, 2001.

BEUTIN, L.; MIKO, A.; KRAUSE, G.; PRIES, K.; HABY, S.; STEEGE, K.; ALBRECHT, N. Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, n. 15, p. 4769-4775, 2007.

BEXIGA, R.; CAVACO, L. M.; VILELA, C. L. Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 100, p. 39-44, 2005.

BITTENCOURT, A. J. Aspectos clínico-epidemiológicos de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em bovinos e eqüinos em Espírito Santo do Pinhal - SP. 120 p. Tese (Doutorado) Departamento de Parasitologia, Instituto de Veterinária, UFRRJ, 1998.

BLANC, G.; BRUNEAU, J.; CHABAUD, A. Quelques essais de transmission de la toxoplasmose par arthropodes piqueurs. *Annales Institut Pasteur*, v. 78, p. 277-280, 1950.

BRADLEY, A.J.; BREEN, J.E. GREEN, M.J. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *The Veterinary Record*, v. 160, p. 253-258, 2007.

BRAMLEY, A.J., HILLERTON, J.E., HIGGS, T.M.; HOGBEN, E.M. The carriage of summer mastitis pathogens by muscid flies. *British Veterinary Journal*, v.141, p.618-627, 1985.

BRANT, M.C.; FIGUEIREDO, J.B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, p. 595-606, 1994.

BRAVERMAN, Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. The role of house flies (*Musca domestica*) in harboring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 18, n. 3, p. 681-690, 1999.

BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H.M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, n. 5, p. 967-73, 2003.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M.T.; et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n.2, p. 33-35, 1999.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. *Jawetz, Melnick & Adelber Microbiologia Médica*. 20. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 524p.

BRUM, J. G. W; TEIXEIRA, M. O. Doença em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) causada por *Cedecia lapagei* e *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.44, n. 5, p. 441-443, 1999.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7: p. 839-844, 2007.

BUMA, R.; SANADA, H.; MAEDA, T.; KAMEI, M.; KOURAI, H. Isolation and characterization of pathogenic bacteria, including *Escherichia coli* O157: H7, from flies collected at a dairy farm field. *Medical Entomology and Zoology*, v. 50, n. 4, p. 313-321; 1999.

BURG, J. G.; NEELY, D. M. B.; WILLIAMS, N. M.; KNAPP, F. W. Retention and attempt mechanical transmission of *Ehrlichia risticii* by *Stomoxys calcitrans*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 8, p. 43-46, 1994.

CAPDEVILA, J.A.; BISBE, V.; GASSER, I.; ZUAZU, J.; OLIVÉ, T.; FERNÁNDEZ, F.; PAHISSA BERGA, A. *Enterobacter amnigenus*. An unusual human pathogen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 16, n. 8, p. 364-366, 1998.

CARTER, J.E.; EVANS, T.N. Clinically significant *Kluyvera* infections: a report of seven cases. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 123, n. 3, 334-338, 2005.

CASTRO, B. G.; PIRES, S. D; ALMEIDA, B. M. ; AZEVEDO, F. D; MORAES, A. P. R.; FLAUSINO, G; OLIVEIRA, A.; BITTENCOURT, A. J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias causadoras de mastite bovina. In: *Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ*, 11, 2001, Seropédica – RJ, EDUR, v. 11, n. 2, p. 161-164, 2001.

CASTRO, B.G. *Avaliação da microbiota bacteriana de segmentos da mosca Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) em propriedades rurais de municípios da microrregião do Vale do Paraíba Fluminense*. 62 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, 2004.

CASTRO, B.G.; SOUZA, M.M.S.; BITTENCOURT, A.J. Aerobic Bacterial Microbiota in *Stomoxys calcitrans* – Preliminary Studies in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 4, p. 193-197, 2007.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 70, p. 111-121, 1999.

- CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 3462-3465, 1996.
- CHIRICO, J.; JONSSON, P.; KJELLBERG, S.; THOMAS, G. Summer mastitis experimentally induced by *Hidrotaea irritans* exposed to bacteria. *Medical and Veterinary Entomology*, v.11, p. 187-192, 1997.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standart Institute. Document M100-S15, CLSI, Wayne, PA, 2005.
- COHN, L.A.; GARY, A.T.; FALES, W.H.; MADSEN, R.W. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, n. 4, p. 338-343, 2003.
- COSTA, E.O., MELVILLE, P.A., RIBEIRO, A.R., Infecções intramamárias em novilhas primíparas no período pré ao pós-parto e sua importância no controle de mastite. *Napgama*, n.1, p.16-20, 1999.
- CRAY, JR.W.C.; MOON, H.C. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Applied Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1586- 1590, 1995.
- CULLOR, J. S., TYLER, J. W., SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. *Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais*. São Paulo, 1994. v.2, p.1041- 1060.
- CUPP, E. W.; KEMEN, M. J. The role of stable fly and mosquitoes in the transmission of equine infectious anemia virus. *Procedures of the United States Animal Health Association*, v. 84, p. 362-367, 1980.
- DAVIS, O.; WALL, B.M. "Broom straw peritonitis" secondary to *Cedecea lapagei* in a liver transplant recipient. *Peritoneal Dialysis International*, v, 26, n. 4, p. 512-513, 2006.
- DE TONI, F. *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) em Crianças no Estado do Paraná. Curitiba, 2003. 87f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Área de Concentração Análises Clínicas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
- DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina *Acta Veterinaria Brasílica*, v.1, n.1, p.23-27, 2007.
- DIENBEN, C. P. A. Enkele surraoverbrengingsproevn met *Stomoxys calcitrans* en *Ctenocephalides canis*. *Nederl.*, v. 40, p. 57-83, 1928.
- DIEZ-GONZALEZ, F.; CALLAWAY, T.R.; KIZOOLIS, M.G.; RUSSEL, J.B. Grain feeding and the dissemination of acid-resistance *Escherichia coli* from cattle. *Science*. v. 281, n. 5383, p. 1666-1668, 1998.
- DÖPFER, D.; BARKEMA, H.W.; LAM, T.J.G.M. et al. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 80-85, 1999.

DUBOUIX, A.; ROQUES, C.; SEGONDS, C.; JEANNOT, M.J.; MALAVAUD, S.; DAUDE, S.; CHABANON, G.; MARTY, N. Epidemiological investigation of a *Serratia liquefaciens* outbreak in a neurosurgery department. *Journal of Hospital Infection*, v. 60, n. 1, p. 8-13, 2005.

ECHEVERRIA, P.; HARRISON, B.A.; TIRAPAT, C.; McFARLAND, A. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 46, n.1, p. 32-36, 1983.

EDWARDS, J. F.; WIKSE, S. E.; FIELD, R. W.; HOELSCHER, C. C.; HERD, D. B. Bovine teat atresia associated with horn fly (*Haematobia irritans* (L.))-induced dermatitis. *Veterinary Pathology*, v. 37, n. 4, p. 360-364, 2000.

ERDMANN, G.R.; KHALIL, S.K. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, v. 23, n. 2, p. 208-211, 1986.

ESTEN, W.N.; MASON, C.J. Sources of bacteria in milk. *Connecticut Agriculture Experimental Station Bulletin*, v. 51: p. 94-98. 1908

FAGUNDES, H. *Ocorrência de Staphylococcus aureus e Escherichia coli O157:H7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo*. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, 2007.

FALAGAS, M.E.; KAVVADIA, P.K.; MANTADAKIS, E.; KOFTERIDIS, D.P.; BLIZIOTIS, I.A.; SALOUSTROS, E.; SAMONIS, G. *Morganella morganii* infections in a general tertiary hospital. *Infection*, v. 34, n. 6, p. 315-321, 2006.

FANG, W.; PYORALA, S. Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 76-82, 1996.

FARAH, S.M.S.S. *Características fenotípicas e genotípicas de estirpes de Escherichia coli produtora de toxina shiga (STEC) isoladas de bovinos no estado do Paraná*. Curitiba, 2005. 65 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

FARIA, V.P. Qualidade: um tema atual para o futuro do leite. *Revista Balde Branco*, v. 405, p. 20-26, 1998.

FENG, P. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerging Infectious Diseases*, v.1, n. 2, p. 47-52, 1995.

FERREIRA, J.L.; FREITAS, J.L.; LINS, H.A.; CAVALCANT, T.V.; MACEDO, N.A.; BORJAS, A.R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, n. 2, p. 261-266, 2007.

FISHER, O. The importance of Diptera for transmission, spreading and survival of agents of some bacterial and fungal disease in human and animals. *Veterinary Medicine*. v. 44, n. 5, p. 133-160, 1999.

FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. V.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer fly (*Chrisops flavidus*) and stable fly (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, n. 1, p.155-156, 1983.

FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. 1.ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.175 p.

FÖRSTER M, KLIMPEL S, MEHLHORN H, SIEVERT K, MESSLER S, PFEFFER K. Pilot study on synanthropic flies (e.g. Musca, Sarcophaga, Calliphora, Fannia, Lucilia, Stomoxys) as vectors of pathogenic microorganisms. *Parasitology Research*, v. 101, n. 1, p. 243-246, 2007.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2005. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br>. > Acessado em 05 de outubro de 2007.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2006. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br>. > Acessado em 05 de outubro de 2007.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2007. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br>. > Acessado em 05 de outubro de 2007.

FURMAN, D.P.; CATTS, E.P. *Manual of Medical Entomology*, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1982. 207 p.

GAYNOR, K.; PARK, S.Y.; KANENAKA, R.; COLINDRES, R.; MINTZ, E.; RAM, P.K.; KITSUTANI, P.; NAKATA, M.; WEDEL, S.; BOXRUD, D.; JENNINGS, D.; YOSHIDA, H.; TOSAKA, N.; HE, H.; CHING-LEE, M.; EFFLER, P.V. International foodborne outbreak of Shigella sonnei infection in airline passengers. *Epidemiology and Infections.*, v.4, p. 1-7, 2008.

GONÇALVES, C.R.; VAZ, T.M.; LEITE, D.; PISANI, B.; SIMOES, M.; PRANDI, M.A.; ROCHA, M.M.; CESAR, P.C.; TRABASSO, P.; VON NOWAKONSKI, A.; IRINO, K. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to Enterobacter cloacae and Enterobacter agglomerans in Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2000.

GRACZYK, T. K.; KNIGHT, R.; GILMAN, R. H.; CRANFIELD, M. R. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes and Infection*, v. 3, p. 231-235, 2001.

GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol. I: Ecology, classification and biotic association*. Princeton: Princeton University Press, 1971. 856p.

GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol II: Biology and diseases transmission*. Princeton: Princeton University Press, 1973. 447 p.

GREENBERG, B.; KLOWDEN, M. Enteric bacterial interactions in insects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 25, n. 12, p. 1459-1466, 1972.

GRIF, K.; KARCH, H.; SCHNEIDER, C.; DASCHNER, F.D. Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157 - Phenotypic methods and genotypic subtyping. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.32, p.165-176, 1998.

GRIMONT, P.A.; GRIMONT, F. Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 73-83, 1978.

GUIMARÃES, J. H. Mosca dos estábulos - Uma importante praga do gado. *Agroquímica Ciba - Geigy*, n. 23, p. 10 - 14, 1984.

GUPTA, S. R.; RAO, C. K.; BISWAS, H.; KRISHNASWAMI, A. K.; WATYTAL, B. L.; RAGHVEN, N. G. S. Role of house fly in the transmission of intestinal parasitic cystis/ova. *Indian Journal of Medical Research*, v. 60, n.8, p. 1120-1125, 1972.

GÜRTLER, V.; MAYALL, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, v. 51, p. 3-16, 2001.

GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, p. 535-536, 2002a.

GUTH, B.E.C.; RAMOS, S.R.T.S.; CERQUEIRA, A.M.F.; ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1085-1089, 2002b.

GUTH, B.E.C.; VAZ, T.M.I.; GOMES, T.A.T.; CHINARELLI, S.H.; ROCHA, M.M.M.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; IRINO, K. Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 805-806, 2005.

HAMILTON, J. V.; LEHANE, M. J.; BRAIG, H. R. Isolation of *Enterobacter sakakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 10, p. 1355-1356, 2003.  
HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; RICE, D.H. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and impact of management practices. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. (Ed.). *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains*. Washington, D.C.: ASM Press, 1998, p. 85-91.

HARADA, F. Investigations of hookworm larvae. Iv. On the fly as a carrier of infective larvae. *Yokohama Medical Bulletin*, v. 5, p. 282-286, 1954.

- HECKER, A. Untersuchungen zur Bekämpfung der maul-und Klauenseuche. *Berl. Thierärztl. Wochenschr.*, v. 34, p. 407-411, 1899 apud GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol II: Biology and diseases transmission*. Princeton: Princeton University Press, 1973. 447 p.
- HEDGES, S. A. *Handbook of Pest Control*, Cleveland: Franzak and Foster Editora, Ohio, 1990 In: GRACZYK, T. K.; KNIGHT, R.; GILMAN, R. H.; CRANFIELD, M. R. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes and Infection*, v. 3, p. 231-235, 2001.
- HERNÁNDEZ, M.; JIMÉNEZ ARGUEDAS, G.; HERNÁNDEZ, V.; HERRERA, M.L.; VARGAS, A.; HERRERA, J.F. Ventriculitis por *Cedecea lapagei*: Reporte de un caso. *Acta Pediatrica Costarrica*, v. 17, n. 1, p. 29-31, 2003.
- HILLERTON, J. E.; BRAMLEY, A. J. Carriage of *Corynebacterium pyogenes* by cattle nuisance flies *Hydrotaea irritans* (Fallen) and *Musca autumnalis* (De Geer). *Veterinary Parasitology*. v. 18, n. 3, p. 223-228, 1985.
- HILLERTON, J.E., BRAMLEY, A.J.; THOMAS, G. The role of *Hidrotaea irritans* in the transmission of summer mastitis. *British Veterinary Journal*, v.146, p.147-156, 1990.
- IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z.V.F.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. O157: H7 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in Sao Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 4, p. 446-447, 2002.
- IRINO, K.; KATO, M. A. M. F., VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 105, p. 29-36, 2005.
- IWASA, M.; MAKINO, S. I.; SAKURA, H.; KOBORI, H.; MORIMOTO, Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a cattle farm in Japan. *Journal of Medical Entology*, v. 36, n. 1, p. 109-112, 1999.
- JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The genus *Hafnia*: from soup to nuts. *Clinical Microbiology Review*, v.19, n. 1, p. 12-18, 2006.
- JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L.; KROSKE-BYSTROM, S.; CHEUNG, W.K.; POWERS, C.; KOKKA, R.P.; TAMURA, K. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 9, p. 1997-2001, 1991.
- JASPER DE, DELLINGER JD, BUSHNELL RB. Herd studies on coliform mastitis. *Journal of American Veterinary and Medical Association*, v. 166, n. 8, p. 778-780, 1975.
- JONES, T.O. *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. A review of the literature. *Veterinary Bull.*, v. 60, p. 205-231, 1990.
- JOURDAN, M. C.; D´ALMEIDA, J. M.; TIBANA, A.; PEREIRA, N. S. Dípteros muscóides como possíveis disseminadores de agentes patógenos. *Resumos XXV Congresso Brasileiro de Medicina Tropical*, Florianópolis, 215 p., 1989.

JULIASSE, M. A. M.; BITTENCOURT, A. J. Aspectos clínico-epidemiológicos de *Stomoxys calcitrans* em bovinos e eqüinos em propriedades rurais de diferentes áreas fisiográficas do estado do Rio de Janeiro. In: *Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ*, 10, Seropédica, Anais..., Rio de Janeiro: Editora Universidade Rural, v. 10, 2000, p. 209-210.

KADAVY, D.R.; HORNBY, J.M.; HAVERKOST, T.; NICKERSON, K.W. Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, n. 11, p. 4615-4619, 2000.

KAGKLI, D.M.; VANCANNEYT, M.; VANDAMME, P.; HILL, C.; COGAN, T.M. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 5, p. 1393-1405, 2007.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. v. 2, p. 123-140. 2004.

KEEN, J.; DURSO, L.; GERHARDT, R.; JONES, C.; WATSON, W.; HOGSETTE, J.; KEEN, D. Seasonality and transmission of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* infections in cattle: agro-ecological and molecular epidemiologic evidence of a role for pest flies. In: *International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing Escherichia coli Infections*, 6, Melbourne, Proceedings..., Melbourne, 2006.

KHALIL, K.; LINDBLOM, G.B.; MAZHAR, K.; KAIJSER, B. Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiology Infections*, v. 113, n. 3, p. 435-444, 1994.

KHAMPANG, P.; CHUNGJATUPORNCHAI, W.; LUXANANIL, P.; PANYIM, S. Efficient expression of mosquito-larvicidal proteins in a gram-negative bacterium capable of recolonization in the guts of *Anopheles dirus* larva. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.51, n. 1, p. 79-84, 1999.

KIM, J.Y.; KIM, S.H.; KWON, N.H.; BAE, W.K.; LIM, J.Y.; KOO, H.C.; KIM, J.M.; NOH, K.M.; JUNG, W.K.; PARK, K.T.; PARK, W.K. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. *Journal of Veterinary Science*, v. 6, n.1, p. 7-19, 2005.

KOBAYASHI, M.; SASAKI, T.; SAITO, N.; TAMURA, K.; SUZUKI, K.; WATANABE, H.; AGUI, N. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *American Journal of Tropical Medical Hygiene*, v. 61, n. 4, p. 625-629, 1999.

KONEMAN, E. W.; JANDA, S. D.; SCHRECKENBERGER, W. M.; WINN JR, P. C. *Diagnóstico Microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001, 1465 p.

KORAH, S.; BRAGANZA, A.; JACOB, P.; BALAJI, V. An "epidemic" of post cataract surgery endophthalmitis by a new organism. *Indian Journal of Ophthalmology*, v. 55, n. 6, p. 464-466, 2007.

LAARMAN, J. J. Transmission of experimental toxoplasmosis by *Stomoxys calcitrans*. *Documents of Medical Geographic Tropic*. v. 8, p. 293-298, 1956.

LAFFRANCHI, A., MULLER, E.E., FREITAS, J.C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciência Rural*, v.31, n.6, p.1027-1032, 2001.

LAISON, R.; SOUTHGATE, B. A. Mechanical transmission of *Leishmania mexicana* by *Stomoxys calcitrans*. *Transmission of the Royal Society of Tropical Medical Hygiene*, v. 59, p. 716, 1965.

LANGENEGER, J.; VIANI, M. C. E.; BAHIA, M. G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.1, n.2, p. 47-52. 1981.

LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; DE AVILA, F.A.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: Flora bacteriana aeróbica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 20, n. 5, p. 204-209, 1998.

LARANJA, L.F.; MACHADO, P.F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. *Scientia Agricola*, v.51, p.578-585, 1994.

LAWSON, J. R.; GEMMEL, M. A. Hydatidosis and cisticercosis: The dynamics of transmission. *Advances in Parasitology*. v. 22, p. 261-288, 1983.

LEE, J.; CAREY, J.; PERLMAN, D.C. Pneumonia and bacteremia due to *Serratia odorifera*. *Journal of Infections*, v. 53, n. 3, p. 212-214, 2006.

LEE, K.E.; LEE, Y. Isolation of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 from swine in Korea. *Journal of Microbiology*, v. 45, n. 6, p.590-592, 2007.

LEHTOLAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; PYÖRÄLÄ, S.; PELKONEN, S. Association between virulence factors and clinical course of *Escherichia coli* mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 44, n. 3-4, p. 203-205, 2003.

LEUNITA SUMBA, A.; MIHOK, S.; OYIEKE, A. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. Taeniatus* in a laboratory mouse model. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 12, p. 417-422, 1998.

LEVINE, O.S.; LEVINE, M.M. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. *Review in Infectious Diseases*, v. 13, n. 4, p. 688-696, 1991.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. IN: GYLES, C.L. *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Wallingford: Cab International, 1994, p. 31-72.

LIRA, W.M.; MACEDO, C.; MARIN, J.M.. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, p. 861-866, 2004.

LUNDGREN, J.G.; LEHMAN, R.M.; CHEE-SANFORD, J. Bacterial Communities within Digestive Tracts of Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annals Entomology Society of America*, v. 100, n. 2, p. 275-282, 2007.

MACHADO, P.F. O panorama da qualidade na Região Sudeste – São Paulo. In: *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; EPAMIG/CT/ILCT, 2003. 168 p.

MADSEN, M., SORENSEN, G. H.; NIELSEN, S. A. Studies on the possible role of cattle nuisance flies, especially *Hidrotaea irritans*, in the summer mastitis in Denmark. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 5, p.421-429, 1991.

MARCHINI, D.; ROSETTO, M.; DALLAI, R.; MARRI, L. Bacteria associated with the oesophageal bulb of the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae). *Current Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 120-124, 2002.

MARCONDES, C. B. *Entomologia Médica e Veterinária*. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 432 p.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of Enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens *Proceedings. National Academy USA*, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MCGINNIS, A.; GAUNT, P.; SANTUCCI, T.; SIMMONS, R.; ENDRIS, R. In vitro evaluation of the susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to florfenicol. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, n. 6, p. 576-579, 2003.

MELLO, R. P. *Estudo de alguns aspectos do desenvolvimento biológico e do comportamento em laboratório de Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758) (Diptera:Muscidae)*. 122 p., Tese (Doutorado) Departamento de Parasitologia, Instituto de Veterinária, UFRRJ, 1989.

MENEZES, E. A. Frequência de *Serratia* sp em infecções urinárias em pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37, n. 1, p. 70-71. 2004.

MENEZES, E.A.; CARNEIRO, H.M.; CUNHA, F.A.; OLIVEIRA, I.R.N.; ÂNGELO, M.R.F.; SALVIANO, M.N.C. Frequência de Microrganismos Causadores de Infecções Urinárias Hospitalares em Pacientes do Hospital Geral de Fortaleza. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 37, n. 4, p. 243-246, 2005.

MIHOK, S.; MARAMBA, O.; MUNYOKI, E.; KAGOIYA, J. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxinae (Diptera: Muscidae). *Tropical Medical and Parasitology*, v. 46, n. 2, p. 103-105, 1995.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO MAPA. Instrução Normativa 51. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br>. > Acessado em 12 de outubro de 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Levantamento da *causa mortis* no Brasil em 2005. Disponível em < [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id\\_area=974](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=974) > Acessado em 09 de fevereiro de 2008.

MITZMAIN, M. B. The role of *Stomoxys calcitrans* in the transmission of *Trypanosoma evansi*. *Philippine Journal of Science*, v. 7, p. 475-519, 1912.

MORAES, A.P.R.; BADINI, P.V.; SOUZA, M.M.S. DE; BITTENCOURT, A.J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 4, p. 143-149, 2004.

MORRIS, M.C.; JOYCE, M.A.; HEATH, A.C.; RABEL, B.; DELISLE, G.W. The responses of *Lucilia cuprina* to odours from sheep, offal and bacterial cultures. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 11, n. 1, p. 58-64, 1997.

NADZHALFOV, I. G. The role of different species of sinantropic flies in dissemination of oncosphere of *Taeniarhynchus saginata*. *Meditinskaya Parasitologiya i Parazitarnye Bolenzni*. V. 36, p. 144-149. 1967 *apud* LAWSON, J. R.; GEMMEL, M. A. Hydatidosis and cisticercosis: The dynamics of transmission. *Advances in Parasitology*. v. 22, p. 261-288, 1983.

NASCIMENTO, E.A.; MORAES, M.M.; SCHNEIDER, C.H.; STADLER, G.; BARBOLA, I.F.; PILEGGI, M. Insetos do aterro sanitário de Ponta Grossa, Paraná, como potenciais disseminadores de enterobactérias patogênicas. *Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 9, n. 1, p. 7-12, 2003.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.88, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. *Current concepts of bovine mastitis*. 4 ed. Madison: NCM, 1996. 64 p.

NAYDUCH, D.; NOBLET, G.P.; STUTZENBERGER, F.J. Fate of bacteria, *Aeromonas caviae*, in the midgut of the housefly, *Musca domestica*. *Invertebrate Biology*, v. 124, n. 1, p. 74-78, 2005.

NAZNI, W.A., SELEENA, B., LEE, H.L., JEFFERY, J.1, T. ROGAYAH, T.A.R. AND SOFIAN, M.A. Bacteria fauna from the house fly, *Musca domestica* (L.) *Tropical Biomedicine*, v. 22, n. 2: p. 225-231, 2005.

NICKERSON, S. C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R. L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *Journal of Dairy Science*. v. 78, n. 7, p. 1607-1618, 1995.

O'CALLAGHAN, M.; GARNHAM, M. L.; NELSON, T. L.; BAIRD, D.; JACKSON, T. A. The Pathogenicity of *Serratia* Strains to *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 68, n. 1, p. 22-27, 1996.

OLIVEIRA, S.M.; MORAES, B.A.; GONÇALVES, C.A.; GIORDANO-DIAS, C.M.; D'ALMEIDA, J.M.; ASENSI, M.D.; MELLO, R.P.; BRAZIL, R.P. Prevalence of microbiota in the digestive tract of wild females of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 3, p. 319-322, 2000.

OLIVEIRA, V. C.; MELLO, R. P.; D'ALMEIDA, J. M. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v.36, n. 5, p. 614-620, 2002.

OLIVEIRA, V. C; D'ALMEIDA, J. M; ABALEM DE SÁ, I. V; MANDARINO, J. R; SOLARI, C. A. Enterobactérias associadas a adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Diptera: Calliphoridae) no Jardim Zoológico, Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 556-561, 2006.

OLSEN, A. R. Regulatory action criteria for filth and other extragenous materials. III. Review of flies and foodborne enteric diseases. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 28, p. 199-211, 1998.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. *Journal of Higiene*, v. 95, p. 551-575, 1985.

OWENS, W. E.; OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; RAY, C. H.; NICKERSON S. C. 1998. Role of horn fly (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 9, p. 1122-1124, 1998.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA, D.F.; FERREIRA. L.C.S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinic Microbiology*, v. 35, p. 1521-1525, 1997.

PARDO, P.E., METTIFOGO, E., MULLER, E.E. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, n.3-4, p.115-118, 1998.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Review*, v. 11, p. 450-479, 1998.

PENATTI, M.P.; HOLLANDA, L.M.; NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; LANCELLOTTI, M.; ANGELLINI, M.; BROCCHI, M.; ROCHA, M.M.; DIAS DA SILVEIRA, W. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.40, n. 2, p. 249-258, 2007.

PERRUCCI, S.; ROSSI, G. Aerobic and microaerophilic bacteria isolated from *Psoroptes cuniculi*. *Parassitologia*, v. 44, n. 3-4, p. 149-151, 2002.

PERSSON, S.; OLSEN, K.E.P.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K.A.; GERNER-SMIDT, P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clinical Microbiology Infection*, v. 13, p. 516-524, 2007.

PIGATTO, C P. *Isolamento e frequência de Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no Estado do Paraná*. Curitiba, 2003. 85f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Área de concentração Patologia, Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

POTGIETER, F. T.; SUTHERLAND, B.; BIGGS, H. C. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 48, n. 2, p. 119-122, 1981.

PRUIMBOOM-BREES, I.M.; MORGAN, T.W.; ACKERMANN, M.R.; SAMUEL, J.E.; CORNICK, N.A.; MOON, H.W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *PNAS*. v. 97, p. 10325-10329, 2000.

RADOSTITS, O. M., BLOOD D.C.; GAY, C.C. *Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737 p., 2002.

RAY, P.; DAS, A.; GAUTAM, V.; JAIN, N.; NARANG, A.; SHARMA, M. *Enterobacter sakazakii* in infants: Novel phenomenon in Índia. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 25, n. 4, p. 408-410, 2007.

REGUA-MANGIA, A.H.; GUTH, B.C.; ANDRADE, J.R.C.; IRINO, K., PACHECO, A.B.F.; FERREIRA, L.C.S.; ZAHNER, V.; TEIXEIRA, L.M. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 40: 155-162, 2004.

REGUA-MANGIA, A.H.; ANDRADE, J.R.C.; GONZALEZ, A.G.M.; ZAHNER, V.; CERQUEIRA, A.M.F.; TEIXEIRA, L.M. Genetic relatedness of a non-motile variant O157 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strain and *E. coli* strains belonging to pathogenic related groups. *Microbiology Research* (in press). 2007.

RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR., W.; GOMES, J. F. Relação de CMT positivo e crescimento microbiológico no diagnóstico da mastite bovina na região sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 21., e CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 3., 2001, Goiânia. Anais...Goiânia: SBZ, 2001. p.98.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 3, p.287-290, 2003.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.724-731, 2006.

RICHARDS, C.S. *American Journal of Tropical Medicine* v. 10: p. 44. In: Houseflies, the Availability of water, and Diarrhoeal Diseases. *Bulletin of World Health Organisation*, v. 41, n.6: p. 952-959. 1961.

ROCHON, K.; LYSYK, T.J.; SELINGER, L.B. Persistence of *Escherichia coli* in immature house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) in relation to larval growth and survival. *Journal of Medical Entomology*, v. 41, n. 6, p. 1082-1089, 2004.

- ROCHON, K., LYSYK, T. J.; SELINGER, L. B. Retention of *Escherichia coli* by house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) during pupal metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 3, p. 397-403, 2005.
- ROMERO, A.; BROCE, A.; ZUREK, L. Role of bacteria in the oviposition behaviour and larval development of stable flies. *Medical and Veterinary Entomology*. v. 20, n. 1, p. 115-121, 2006.
- ROSENAU, M. J.; BRUES C. T. Some experimental observations upon monkeys concerning the transmission of poliomyelitis through the agency of *Stomoxys calcitrans*. In: 15 th International Congress of Hygiene Demography, v. 1: p. 616-623, 1912. apud. GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol II: Biology and diseases transmission*. Princeton: Princeton University Press, 1973. 447 p.
- SABRÁ, A. ECEP, ECET, ECEA, ECEH, ECEI, ECAD: a *E. coli* revisitada no contexto da diarreia aguda. *Jornal de Pediatria*. v. 77, n. 1, p. 5-7, 2002.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplica à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte, Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
- SANCHEZ-CARLO, V., WILSON, R.A., MCDONALD, J.S. AND PARKER, R.A. Biochemical and serologic properties of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 45, p. 1771-1774, 1984.
- SANCHO, E.; CABALLERO, M.; RUÍZ-MARTÍNEZ, I. The associated microflora to the larvae of human bot fly *Dermatobia hominis* L. Jr. (Diptera: Cuterebridae) and its furuncular lesions in cattle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 3, p. 293-298, 1996.
- SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI JR, A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.
- SASAKI, T.; KOBAYASHI, M.; AGUI, N. Epidemiological potencial of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food. *Journal of Medical Entomology*, v. 37, n. 6, p. 945-949, 2000.
- SCHALM, O.W.; NORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.130, p. 199-204, 1957.
- SCHIRCORE, T. D. A note on some helminthic diseases with special reference to the house fly as a nature carrier of ova. *Parasitology*, v. 7, p. 239-243, 1916. In: GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol II: Biology and diseases transmission*. Princeton: Princeton University Press, 1973. 447 p.
- SCHMIDT, H.; BEUTIN, I; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 1055-1061, 1995.

SCHOFIELD, S.; TORR, S. J. A comparison of the feeding behavior of tsetse and stable flies. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 16, p. 177-185, 2002.

SCOTT, J. W. Insect transmission of swamp fever. *Science*, v. 42, p. 659, 1915. apud. GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol II: Biology and diseases transmission*. Princeton: Princeton University Press, 1973. 447 p.

SHPIGEL, N.Y.; WINKLER, M.; ZIV, G.; SARAN, A. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 35, p. 1-9, 1998.

SILVA, L.R., *Pesquisa de Escherichia coli O157:H7 em bovinos abatidos em matadouro frigorífico de Curitiba-Paraná*. Curitiba, 2002. 144f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Paraná.

SMITH, B. P. *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. São Paulo, Manole, 1994. 1738p.

SOL, J. Summer mastitis: epidemiology, etiology, prevention and therapy. *Mastitis treatment making it working*. In: British Mastitis Conference, 3., 1990, Stoneleigh, *Proceedings...* Stoneleigh, UK, 1990, p. 28-35.

SORIANO, A.L.; RUSSELL, R.G.; JOHNSON, D.; LAGOS, R.; SECHTER, I.; MORRIS, J.G. Pathophysiology of *Citrobacter diversus* neonatal meningitis: comparative studies in an infant mouse model. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 4, p. 1352-1358, 1991.

SOULSBY, E. J. L. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7 ed., Editorial Interamericana, Mexico DF, 1982, 823 p.

SOUTO, L.I.M. Associação entre o índice de mastite em rebanhos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no estado de São Paulo, Brasil. 2006. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses) - Universidade de São Paulo.

STEIN, C. D.; LOTZE, J. C.; MOTT, L. O. Transmission of equine infectious anemia or swamp fever by the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, the horse fly, *Tabanus sulcifrons* (Macquart) and by injections of minute amounts of virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 3, p. 183-193, 1942. apud GREENBERG, B. *Flies and diseases. Vol II: Biology and diseases transmission*. Princeton: Princeton University Press, 1973. 447 p.

STORK, M. G. The epidemiological and economic importance of fly infestation of meat and milk producing animals in Europe. *The Veterinary Record*, v. 105, p.341 - 343, 1979.

SULAIMAN, S.; OTHMAN, M.Z.; AZIZ, A.H. Isolations of enteric pathogens from synanthropic flies trapped in downtown Kuala Lumpur. *Journal of Vector Ecology*, v.25, n. 1, p. 90-93, 2000.

ZWALD, A.G.; RUEGG, P.L.; KANEENE, J.B. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 191-201, 2004.

- TARRY, D. W.; BERNAL, L.; EDWARDS, S. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Veterinary Record*, v. 128, p. 82-84, 1991.
- TARRY, D.W.; CARROLL, P.J. Summer mastitis: transmission by blood feeding flies. *The Veterinary Record*, v. 10, p.304, 1988.
- THOMAS, G.; SCHOMAKER, C. H.; BEEN, T. H.; van der BERG, M. J.; PRIJS, H. J. Host finding and feeding in *Hydrotaea irritans* (Diptera, Muscidae): the role of chemical senses. *Veterinary Parasitology*. v. 18, n. 3, p. 209-221, 1985.
- TODHUNTER D.A., SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Growth of Gram-negative bacteria in dry cow secretion. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 363, 1990.
- TODHUNTER, D.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Growth of gram-negative bacteria in dry cow secretion. *Journal of Dairy Science*,v. 73, n. 2, p. 363-372, 1990.
- TURELL, M. J.; KNUDSOM, G. B. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infection and Immunology*, v. 55, n. 8, p. 1859-1861, 1987.
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. *Parasitologia Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273 p.
- VALGODE, M. A. Exigências térmicas e temperatura base das formas imaturas de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae). 67 p., (Tese de Mestrado), Departamento de Parasitologia, Instituto de Veterinária, UFRRJ, 1990.
- VANSELOW, B.A.; HORNITZKY, M.A.; WALKER, K.H.; EAMENS, G.J.; BAILEY, G.D.; GILL, P.A.; COATES, K.; CORNEY, B.; CRONIN, J.P.; RENILSON, S. *Salmonella* and on-farm risk factors in healthy slaughter-age cattle and sheep in eastern Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 85, n.12, p. 498-502, 2007.
- VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; DIAS, A.M.G.; GOMES, T.A.T.; MEDEIROS, M.I.C.; ROCHA, M.M.M.; GUTH, B.E.C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p. 903-905, 2004.
- VERWEYEN, H.M.; KARCH, H.; BRANDIS, M.; ZIMMERHACK, L.B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatric Nephrology*, v. 14, p.73-83, 2000.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v. 18: p. 7213-7218, 1990.
- WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F.B.; ELLIS, R.P.; MAGNUSON R. J. *Escherichia coli* Isolates' Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 3408-3412, 2006.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18: p. 6531-6535, 1990.

YAMAMOTO, S.Y.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H., TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence in *E. coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 12: 85-90. 1995.

YANO, T.; CATANI, C.F.; ARITA, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Purification and partial characterization of a hemagglutinating factor (HAF): a possible adhesive factor of the diffuse adherent of *Escherichia coli* (DAEC). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 38, n. 6, p. 401-406, 1996.

YERUMAN, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N. Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. *The Veterinary Quarterly*, v. 18, n. 3, p. 87-89, 1996.

YOUNG, J.M.; PARK, D.C. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. *Systematic Applied Microbiology*, v. 30, n. 5, p.343-354, 2007.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF*, v.345, p.15-18, 2000.

ZWALD, A.G., RUEGG, P.L.; KANEENE, J.B.; WARNICK, L.D.; WELLS, S.J.; FOSSLER, C.; HALBERT, L.W. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p.191–201, 2004.