

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos
isolados de leitarias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos**

Thamiris Pereira de Moraes

Pelotas, 2019

Thamíris Pereira de Moraes

**Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos
isolados de leitárias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Professor Doutor Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M827s Moraes, Thamíris Pereira de

Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados de leitárias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos / Thamíris Pereira de Moraes ; Cláudio Dias Timm, orientador. — Pelotas, 2019.
47 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Leite. 2. MRSA. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Yersinia enterocolitica*. 5. *Turdus rufiventris*. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Título.

CDD : 616.07

Thamíris Pereira de Moraes

**Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos
isolados de leitarias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos**

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

Data da Defesa: 19/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Natacha Deboni Cereser

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

MORAES, Thamíris Pereira. **Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados de leitárias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos.** 2019. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Vacas podem entrar em contato com micro-organismos patogênicos através das mais diversas fontes, como água contaminada, alimentos, humanos e outros animais, e podem eliminar esses patógenos no leite. As aves silvestres encontram-se nos mais diversos *habitats*, podendo facilmente dispersar micro-organismos, sejam patogênicos ou não, no ambiente ou mesmo transmiti-los para animais domésticos e humanos, bem como podem ser contaminadas por estes. O objetivo deste estudo foi verificar a similaridade genética entre cepas patogênicas isoladas de fezes de vacas em lactação, leite destes mesmos animais, fezes de aves silvestres capturadas no entorno das propriedades leiteiras e amostras de superfície da mão dos ordenhadores. A captura das aves foi feita com redes de neblina, colocadas em locais estratégicos nas propriedades. As amostras de fezes foram obtidas através da inserção de zaragatoas estéreis no reto das vacas e na cloaca das aves capturadas. As amostras de leite foram coletadas no início da ordenha e a coleta de amostras da superfície das mãos dos ordenhadores se deu durante este processo. Os micro-organismos estudados foram *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*. A resistência de *S. aureus* à metilicina foi testada. A similaridade entre os perfis moleculares dos isolados da mesma espécie foi verificada por rep-PCR. Foram feitas coletas em seis propriedades leiteiras, obtendo-se 88 amostras de fezes de vaca e o mesmo número de amostras de leite das mesmas vacas, 11 amostras de superfície de mão de ordenhador e amostras de fezes de 106 aves silvestres. *S. aureus* foi isolado de quatro *Turdus rufiventris* e de um *Cyanoloxia brissonii*, dos quais quatro eram MRSA. *Y. enterocolitica* foi isolada de dois *T. rufiventris* e um *Columbina picui*. Estes micro-organismos, inclusive MRSA, também foram isolados de fezes e leite das vacas em lactação. Não houve isolamento de *Salmonella* e *Listeria*. Em uma mesma propriedade, *S. aureus* isolados de fezes de um *T. rufiventris* e de amostras de leite e fezes de duas vacas apresentaram perfis moleculares idênticos, indicando a ocorrência de contaminação entre os animais domésticos e as aves silvestres. No caso específico de MRSA, considerando a origem da resistência desenvolvida por estas cepas, pode-se concluir que a contaminação inicial partiu de humanos ou animais domésticos para os silvestres, embora estes possam posteriormente servir de disseminadores. Os resultados ressaltam a importância do leite ser produzido com rigoroso protocolo de higiene, em salas de ordenha que não permitam o ingresso de animais estranhos ao processo, que o rebanho leiteiro seja constantemente monitorado quanto aos patógenos presentes e também que o leite sofra tratamento térmico antes do seu consumo.

Palavras-chave: leite; MRSA; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*; *Turdus rufiventris*; *Columbina picui*; *Cyanoloxia brissonii*.

Abstract

MORAES, Thamíris Pereira. **Genetic similarity between pathogenic microorganisms' strains isolated from milk and wild birds captured in these establishments.** 2019. 47f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Cows may come in contact with pathogenic microorganisms from a variety of sources, such as contaminated water, food, humans, and other animals, and can eliminate these pathogens in milk. Wild birds are found in the most diverse habitats and can easily disperse micro-organisms, whether pathogenic or not, into the environment or even transmit them to domestic and human animals, as well as contaminated by them. The objective of this study was to verify the genetic similarity between pathogenic strains isolated from feces of lactating cows, milk from these same animals, feces from wild birds captured around dairy farms and surface samples from the hand of milkers. The capture of the birds was done with mist nets, placed in strategic places in the properties. Fecal samples were obtained by inserting sterile swabs into the rectum of the cows and into the sewer of the captured birds. The milk samples were collected at the beginning of the milking and samples were taken from the hands surface of the computers during this process. The microorganisms studied were *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes*. *S. aureus* resistance to methicillin was tested. The similarity between the molecular profiles of the isolates of the same species was verified by rep-PCR. Samples were collected at six dairy farms, yielding 88 cow feces samples and the same number of milk samples from the same cows, 11 milking hand surface samples and feces samples from 106 wild birds. *S. aureus* was isolated from four *Turdus rufiventris* and a *Cyanoloxia brissonii*, of which four were MRSA. *Y. enterocolitica* was isolated from two *T. rufiventris* and one *Columbina picui*. These microorganisms, including MRSA, were also isolated from feces and milk from lactating cows. There was no isolation of *Salmonella* and *Listeria*. In the same property, *S. aureus* isolated from feces of a *T. rufiventris* and samples of milk and feces from two cows presented identical molecular profiles, indicating the occurrence of contamination between the domestic animals and the wild birds. In the specific case of MRSA, considering the origin of the resistance developed by these strains, it can be concluded that the initial contamination started from humans or domestic animals to the wild, although these could later serve as disseminators. The results highlight the importance of milk being produced with a strict hygiene protocol, in milking parlors that do not allow animals to enter the process, that the dairy herd is constantly monitored for the pathogens present and also that the milk undergoes heat treatment before of its consumption.

Keywords: milk; MRSA; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*; *Turdus rufiventris*; *Columbina picui*; *Cyanoloxia brissonii*.

Lista de Quadros

Quadro 1	<i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>Y. enterocolitica</i>	22
Quadro 2	<i>Primers</i> utilizados na identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i>	23
Quadro 3	Aves silvestres capturadas para pesquisa de <i>Salmonella</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>	23

Lista de Abreviaturas e Siglas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
APT	Água peptonada tamponada
BHI	Caldo infusão cérebro coração
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EUA	Estados Unidos da América
FDA	U.S. Food and Drug Administration
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
mL	Mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PBP	Proteína de ligação à penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pmol	Picomol
rep-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com elemento repetitivo palindrômico
UVM	Caldo de enriquecimento para <i>Listeria</i> (<i>Universisty Vermont medium</i>)

Sumário

1 Introdução.....	9
2 Revisão da Literatura.....	12
3 Artigo.....	18
4 Considerações Finais.....	32
Referências.....	33
Anexos.....	39

1 Introdução

O Brasil possui uma das mais ricas avifaunas do mundo (PIACENTINI et al. 2015). As aves silvestres encontram-se nos mais diversos *habitats*, podendo facilmente dispersar micro-organismos, sejam patogênicos ou não, no ambiente ou mesmo transmiti-los para animais domésticos de produção, como os bovinos, e humanos, bem como podem ser contaminadas por estes (CUNHA et al., 2016; GAUKLER et al., 2009; HALL e SAITO, 2008; HUBÁLEK, 2004).

Já, as vacas podem ser expostas a patógenos através de água contaminada, alimentos, humanos e outros animais e contaminação ambiental. Embora todas as fases da obtenção e industrialização do leite sejam importantes para preservação da qualidade, a de maior relevância é a produção. Os problemas nas propriedades rurais, que acarretam contaminação do leite, incluem a ocorrência de processos inflamatórios nas mamas, mastite, em que muitas vezes os animais não demonstram sinais clínicos visíveis, e falhas no processo higiênico durante a ordenha (GERMANO e GERMANO, 2015). O leite é considerado o alimento mais completo que existe para o ser humano e merece destaque, quando contaminado, como responsável por surtos de gastroenterite (GERMANO e GERMANO, 2015).

As diarreias de natureza infecciosa, principalmente aquelas provocadas por agentes bacterianos, constituem um dos mais importantes problemas de saúde pública de repercussão mundial e continuam a representar a principal causa de óbito entre crianças que habitam países em desenvolvimento. Essas patologias fazem parte das denominadas DTA. A transmissão dos patógenos dos animais silvestres para os humanos e animais domésticos e vice-versa é um risco para o desenvolvimento de doenças, além de ser um fator de disseminação destes micro-organismos no ambiente. Em 2017, no Brasil, houve 598 surtos de DTA, além de 47.218 pessoas expostas, das quais 9.320 ficaram doentes e ocorreram 12 óbitos. Do total de surtos, leite e seus derivados foram responsáveis por 3,24% e, dos surtos em que houve identificação do agente, *Salmonella* é a bactéria apontada como principal patógeno responsável por surtos no país, presente em 35% deles. Já *S. aureus* é o terceiro agente causador de DTA, responsável por 18,2% dos surtos (BRASIL, 2018).

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Staphylococcaceae* (TORTORA et al., 2016), geralmente aparecem na forma de cachos de uva quando vistos ao microscópio, são bactérias anaeróbias facultativas, com maior crescimento em condições aeróbias, produzem a enzima catalase (FRANCO e LANDGRAF, 2008) e multiplicam-se entre 7 e 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima para desenvolvimento. *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* apresentam interesse potencial em microbiologia de alimentos, uma vez que resultam em positividade para o teste da coagulase, essas espécies produtoras da enzima coagulase também são capazes de sintetizar enterotoxinas (TIMM et al., 2017). A intoxicação é causada pela ingestão das enterotoxinas pré-formadas no alimento. O homem e os animais são os principais reservatórios (FRANCO e LANDGRAF, 2008), estando presentes nas vias respiratórias e pele, podendo, também, ser encontrados no intestino (BRITTINGHAM et al., 1988). Leite e seus derivados são um grupo de alimentos importante nos surtos de intoxicações causadas por *Staphylococcus*, uma vez que sofrem grande manipulação durante o processo tecnológico (GERMANO e GERMANO, 2015) e também porque *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de mastite.

A partir da década de 1960 o uso de penicilinas penicilinase-estáveis favoreceu o surgimento de cepas bacterianas resistentes, MRSA, o que representa um problema crescente para a saúde pública e animal, porque as infecções causadas por elas são mais difíceis de tratar (SMITH et al., 2017). A resistência é originada pelo gene *blaZ*, que codifica a produção de uma enzima (β -lactamase), produzindo uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a), que tem afinidade diminuída para a maioria dos antibióticos β -lactâmicos. A proteína PBP2a é codificada pelo gene *mecA* (ZETOLA et al., 2005).

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* são bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, produtores de gás a partir de glicose e capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Aproximadamente 1,2 milhões de pessoas adoecem e 450 morrem de salmonelose, anualmente, nos EUA (CDC, 2018). Segundo Millán et al. (2004), as aves silvestres são importante reservatório de *Salmonella*, sendo um risco potencial para humanos e outros animais.

O gênero *Yersinia* reúne um conjunto de bactérias responsável por ampla variedade de patologias, tanto em saúde pública quanto em saúde animal (GERMANO e GERMANO, 2015). Segundo Franco e Landgraf (2008), *Yersinia enterocolitica* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* amplamente distribuída na natureza, que causa no homem infecções entéricas de caráter zoonótico. É um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, catalase positivo e oxidase negativo, capaz de multiplicar-se entre -1,3 a 42°C, e a faixa ótima de desenvolvimento é entre 25 e 37°C. Os animais destinados ao abate, os de estimação, os silvestres, as aves, os répteis e o pescado de modo geral são os reservatórios do agente na natureza.

Listeria monocytogenes é responsável por 1.600 pessoas doentes por ano, nos EUA, assim como por 260 mortes (CDC, 2018). Está amplamente disseminada na natureza e tanto o ser humano, quanto os animais e o ambiente podem ser considerados reservatórios (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Sua importância em saúde pública se deve ao fato de a manifestação clínica ser grave, devido ao comprometimento do sistema nervoso central e também pelo fato de a infecção acometer principalmente gestantes, com consequências severas ao feto, incluindo aborto (GERMANO e GERMANO, 2015).

O estudo dos perfis moleculares de isolados obtidos de fezes de aves silvestres e de bovinos leiteiros, assim como do leite produzido por estes animais e das amostras de superfície de mão de ordenhador é um valioso instrumento para o avanço no conhecimento das enfermidades causadas por estes micro-organismos. A identificação de clones desses patógenos em distintas etapas da cadeia epidemiológica é uma informação importante para a compreensão das formas de transmissão dos agentes etiológicos e para a elaboração de medidas de controle das enfermidades por eles causadas.

2 Revisão da Literatura

No Brasil, entre janeiro de 2007 e maio de 2017, aconteceram 12.660 surtos de DTA, acometendo 2.372.132 pessoas. O principal grupo de micro-organismos envolvidos foi o das bactérias, sendo que, do total de surtos em que o agente foi identificado, 4.431 (35%) foi causado por *Salmonella* e 1.620 (18,2%) por *S. aureus* (BRASIL, 2018). Os responsáveis pelas DTA podem ser eliminados pelas fezes de quem ingeriu o alimento contaminado e, caso essas fezes com o patógeno entrem em contato com pessoas, animais domésticos e silvestres, podem contaminá-los, mesmo sem a veiculação pelo alimento. Algumas das bactérias mais comumente associados a DTA são *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo responsáveis por diversos surtos em todo o mundo (CDC, 2017).

A conservação da diversidade biológica é uma das preocupações mundiais mais atuais, devido a diversos fatores, como a extinção e a vulnerabilidade de espécies, introdução de espécies exóticas e dispersão de doenças, principalmente as infecciosas (SILVA et al., 2010). Ao longo da história, a vida selvagem tem sido uma importante fonte de doenças infecciosas transmissíveis aos seres humanos e outros animais (KRUSE et al., 2004).

As mudanças ecológicas que influenciam a epidemiologia das zoonoses transmitidas por animais de vida silvestre podem ser de origem natural ou antropogênica. Estas incluem expansão e invasão da população humana, reflorestamento e outras mudanças de *habitat*, poluição e mudanças climáticas. A transmissão de micro-organismos a partir de animais silvestres para os seres humanos, direta ou indiretamente, através de animais domésticos, pode ocorrer de várias maneiras. Animais exóticos podem criar sérios problemas de saúde pública quando introduzem uma doença a populações animais nativas e humanas. Assim, o transporte, a venda ou a distribuição de animais ou a liberação deles no meio ambiente pode representar um risco para a disseminação de zoonoses (KRUSE et al., 2004). O papel dos pássaros na transmissão de doenças é subestimado, visto que estas aves podem albergar patógenos primários ou oportunistas (CUNHA et al., 2016). Muitas

espécies de aves silvestres coexistem com humanos e contam com fontes antropogênicas de *habitat* e nutrição (KONICEK et al., 2016). As aves silvestres, especialmente as migratórias, têm alto potencial para dispersar micro-organismos no ambiente, uma vez que se encontram nos mais diversos *habitats*, podendo entrar em contato com animais domésticos e silvestres, alimentos, fômites e pessoas (HUBÁLEK, 2004), contaminando-os ou sendo por eles contaminadas.

O homem e a maioria dos animais domésticos podem ser portadores de *Staphylococcus* spp. Também animais silvestres de diferentes espécies têm sido identificados como portadores dessa bactéria em vários estudos. Thapaliya et al. (2017) isolaram *S. aureus* de 7,1% (13/182) de *Anser anser* coletados em Ohio, EUA. Segundo Monecke et al. (2016), nos últimos anos, surgiram cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina associadas ao gado, especialmente em países com criação de animais em alta densidade, como Holanda e Dinamarca. Estes autores isolaram *S. aureus* de fezes de diversas espécies de aves, 1,5% (1/65) de *Cygnus olor*, 42,86% (3/71) de *Aquila chrysaetos*, 25% (1/4) de *Haliaeetus albicilla*, 12,5% (1/8) de *Strix aluco*, 1% (2/190) de *Perdix perdix*, 100% (2/2) de *Picus viridis*, 10,34% (3/29) de *Pica pica*, 8,82% (9/102) de *Corvus frugilegus* e 9,1% (1/11) de *Parus major*, todos capturados na Alemanha, Áustria e Suécia. Em Daca, Bangladesh, Akhter et al. (2010) isolaram *Staphylococcus* de diversas espécies de psitacídeos (*Nymphicus hollandicus*, *Psittacula kramen*, *P. eupatria*, *P. alexandri* e *P. roseata*) aparentemente saudáveis que se encontravam no zoológico do município.

Tanto o homem como os animais e o ambiente servem como reservatório de *L. monocytogenes*. Lyautey et al. (2007) afirmaram que *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo que pode ser transportado assintomaticamente em vários animais e pode ser eliminado pelas fezes.

Yoshida et al. (2000), no Japão, após analisarem fezes de diversos animais de diferentes espécies, obtiveram isolamento de *L. monocytogenes* em 2% (6/301) de *Corvus corone*. Fenlon (1985), na Escócia, analisou amostras de fezes de diversas espécies de gaivotas e gralhas, através da inserção de zaragatoas nas cloacas desses animais e diretamente do intestino dos animais que eram encontrados mortos. Das amostras analisadas, 8,4% (23/273) foram positivas para *L. monocytogenes*. Esses animais agem como vetores, transferindo micro-organismos de um lugar para outro sem apresentarem sinais clínicos. A bactéria, neste estudo, foi isolada no período de nidificação, na primavera, momento de estresse para as aves, pois os

recursos alimentares podem ser baixos e as aves são frequentemente vistas em cochos usados para alimentar os animais de produção.

Hellström et al. (2007), na Finlândia, avaliaram as fezes de aves que vivem livremente nas cidades e em aterros sanitários, a fim de isolar *L. monocytogenes*, e obtiveram 3% (1/37) de positividade nas fezes de *Larus canus*, 15% (3/20) de *Larus ridibundus*, 13% (2/16) de *Columba livia*, 17% (1/6) de *Larus argentatus* e 25% (1/4) de *Passer domesticus*. Estes autores concluíram que aves selvagens saudáveis geralmente transportam *L. monocytogenes* em seus intestinos e que a prevalência dessa bactéria era maior nas aves que viviam em aterros sanitários do que nas que viviam em áreas urbanas. O ambiente de vida, combinado com os hábitos alimentares de certas espécies de aves, como por exemplo alimentação em locais contaminados com patógenos, provavelmente afeta o transporte fecal de *L. monocytogenes*, variando a prevalência de acordo com esses fatores (HELLSTRÖM et al., 2007).

Pradham et al. (2009), nos Estados Unidos, isolaram *L. monocytogenes* e *Salmonella* de fezes de gado leiteiro e os resultados deste estudo indicaram que agentes endêmicos de doenças infecciosas com potencial zoonótico são comuns em animais leiteiros e em seus ambientes.

Salmonella está amplamente distribuída na natureza. Porém entre os animais, as aves são o reservatório mais importante, pois podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente o micro-organismo pelas fezes (DIAS et al., 2014).

Allgayer et al. (2009), no Brasil, isolaram *Salmonella* de fezes de 7,1% (1/14) de *Anodorhynchus hyacinthinus* que viviam em um centro de reabilitação. Segundo os autores, é essencial que informações sobre a ocorrência e distribuição desse micro-organismo em animais domésticos e silvestres sejam estudadas, uma vez que podem ser responsáveis pela transmissão do patógeno para outros animais silvestres e domésticos, ambiente e humanos.

Skov et al. (2008) afirmaram que a presença de *Salmonella* em produtos alimentícios de origem animal está associada à ocorrência deste micro-organismo na produção animal primária, portanto seriam necessárias estratégias para controlar a introdução e propagação de infecção. Para que essa afirmação pudesse ser feita, os autores realizaram coletas de 2.933 amostras de fezes de animais silvestres e 689 de animais de produção, na Dinamarca. *Salmonella* foi detectada apenas nos silvestres que viviam em ou perto de fazendas onde havia sido previamente detectado o

patógeno nos animais de produção. Em um trabalho realizado no Rio Grande do Sul, Brasil, Dias et al. (2014) isolaram *Salmonella* de 24% (6/23) das amostras de fezes de *Chrysomus ruficapillus* capturados e de 100% (1/1) das amostras de fezes de *Sicalis flaveola* estudados. Já Carlson et al. (2015), nos EUA, encontraram 32% (32/100) de *Sturnus vulgaris* eliminando *Salmonella* nas fezes.

Salmonella spp. foi isolada, entre 1969 e 2000, na Noruega, de 470 aves pertencentes a 26 espécies diferentes. Foram positivos para *Salmonella* 79,6% (195/242) de *Pyrrhula pyrrhula*, 80,3% (57/71) de *Carduelis chloris*, 75,4% (52/69) de *Carduelis spirus*, 78% (32/41) de *Carduelis flammea*, 22,6% (7/31) de *P. domesticus*, 6,9% (6/87) de *Parus major*, 21,4% (3/14) de *Cyanister caeruleus*, 14,3% (2/15) de *Emberiza citrinella*, 9,5% (2/21) de *Fringilla coelebs*, 50% (3/6) de *Passer montanus*, 6,3% (1/16) de *Fringilla montefringilla*, 50% (1/2) de *Coccothraustes coccothraustes* e 12,5% (1/8) de *Poecile montanus*. A grande maioria dos casos ocorreu em passeriformes, representando 14 espécies e compreendendo 94% do material total. Os casos restantes (29) ocorreram em 12 espécies de aves aquáticas, aves de rapina, pombas e corvos. Em todos os casos, *Salmonella* Typhimurium foi encontrada, exceto em um *C. corone*, do qual foi isolado *Salmonella* Paratyphi B var. Java. Esse achado indica que o sorotipo Typhimurium está endemicamente presente na fauna aviária da Noruega (REFSUM et al., 2003). Outra pesquisa realizada no mesmo local, mostrou que as gaivotas e os corvos podem atuar como portadores saudáveis de uma ampla gama de sorovares de *Salmonella* (REFSUM et al., 2002).

Smith et al. (2002), na Califórnia, analisaram 212 amostras fecais de mamíferos e aves marinhas, além de aves de rapina. *Salmonella* dos sorotipos Johannesburg, Montevideo, Newport, Ohio, São Paulo e Enteritidis foi isolada de nove amostras. As espécies positivas foram 10,5% (2/19) de *Circus cyaneus* e 6,3% (2/32) de *Larus occidentalis*. Os autores afirmam que muitas espécies animais transportam *Salmonella*, incluindo mamíferos, répteis e humanos em todos os continentes. As mesmas cepas de *Salmonella* foram isoladas de seres humanos e animais silvestres, sugerindo que a vida selvagem pode servir como reservatório de *Salmonella* que pode acometer humanos. Estresses podem aumentar a suscetibilidade dos animais à infecção ou podem resultar em recrudescência da eliminação de *Salmonella* em portadores.

Kirk et al. (2002) capturaram aves que se encontravam no entorno de laticínios na Califórnia. Embora todos os animais aparentassem estar saudáveis, foram positivos para *Salmonella* 3,1% (14/451) dos *P. domesticus*, 1,6% (1/61) dos *Carpodacus mexicanus*, 1,3% (1/80) dos *S. vulgaris*, 1,3% (1/78) dos *Agelaius phoeniceus*, 2,3% (1/44) dos *Euphagus cyanocephalus*, 3,2% (3/95) dos *Molothrus ater* e 1,2% (1/83) dos *C. livia*. Os sorotipos identificados foram Meleagridis, Montevideo, Muenster e Typhimurium. Esses autores afirmaram que a ocorrência de *Salmonella* em aves selvagens geralmente está associada a congregação de pássaros em estações de alimentação livre ou quintais.

Kapperud e Rosef (1983), analisando fezes de aves, na Noruega, observaram que 0,9% (5/540) apresentavam *Y. enterocolitica* e 0,7% (4/540) *Salmonella*, sendo 50% Typhimurium, 25% Indiana e 25% Djugu. Todos os animais estavam, aparentemente, sadios quando capturados. Foram positivos 7% (3/43) de *Larus argentatus* e 25% (1/4) de *Larus marinus*, para *Salmonella*, além de 2,3% (2/88) de *L. ridibundus* que foram positivos para ambos micro-organismos, e 16,7% (2/12) de *Aegolius funereus*, 20% (1/5) de *Emberiza schoeniclus* e 2,8% (1/36) de *Sterna hirundo*, que foram positivos para *Y. enterocolitica*. Segundo esses autores, hábitos de alimentação relacionados com lixo e esgoto aumentam o risco de infecção para os micro-organismos patogênicos.

Segundo Bancercz-Kisiel et al. (2017) e Platt-Samoraj et al. (2015), a epidemiologia das infecções de *Y. enterocolitica* é complexa e não é totalmente elucidada, porque o patógeno coloniza *habitats* terrestres e aquáticos, e também várias espécies de animais, além disso os mecanismos de circulação ambiental dessa bactéria não são totalmente conhecidos. A participação de animais silvestres de vida livre na disseminação de *Y. enterocolitica* no meio ambiente não pode ser excluída.

Silveira et al. (2018) isolaram *Y. enterocolitica* de 5,5% (4/73) das fezes de *Turdus rufiventris* alocados em um centro de reabilitação, no sul do Brasil. Segundo Steele et al. (2005), a contaminação de animais e humanos por patógenos em um centro de reabilitação pode ser evitada, já que esses micro-organismos são disseminados, na maioria das vezes, por via fecal-oral. Essa disseminação pode ser reduzida com higiene, manejo e desinfecção adequadas. Objetos utilizados no manejo dos animais, como superfícies, cobertores, esponjas, balanças, luvas, são facilmente esquecidos durante a higienização e podem conter bactérias. Para evitar a multiplicação e disseminação desses patógenos, é recomendado que seja feita

higienização regular dos utensílios. Diversos fatores podem ocasionar estresse nos animais, levando-os, caso estejam contaminados, a eliminar os micro-organismos patogênicos nas fezes, portanto diminuir o estresse durante o processo de reabilitação auxilia a reduzir o risco de contaminação. O objetivo principal dos centros de reabilitação é a soltura dos animais novamente para o ambiente, e caso estes ainda carregem micro-organismos patogênicos em seus intestinos, podem liberá-los na natureza, após a soltura.

Além dos animais silvestres de vida livre, o risco representado pelo agrupamento de animais, mesmo de espécies distintas, como ocorre no tráfico de animais silvestres ou em centros de recuperação de animais silvestres, pode estar aumentado devido à maior facilidade de transmissão. Também o uso de silvestres como *pets* exige monitoração cuidadosa para que esses animais não se tornem disseminadores de micro-organismos patogênicos (AKHTER et al., 2010, VIDAL et al., 2017).

3 Artigo

Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados de leitarias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos

Thamíris Pereira de Moraes
Débora Rodrigues Silveira
Celina Nunes Ebersol
Greyce Silveira Mello
Luiz Gustavo Bach
Louise Maciel Fernandes
Cláudio Dias Timm

Será submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

1 **Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados de leitarias e de aves**
 2 **silvestres capturadas nestes estabelecimentos**

3 Genetic similarity between pathogenic microorganisms' strains isolated from milk and wild birds
 4 captured in these establishments¹

5
 6 Thamiris P. de Moraes^{2*}, Débora R. Silveira², Celina N. Ebersol², Greyce S. Mello², Luiz G. Bach²,
 7 Louise M. Fernandes², Cláudio D. Timm²

8
 9 **ABSTRACT.**– Moraes, T. P., Silveira, D.R., Ebersol, C.N., Melo, G.S., Bach, L.G., Fernandes, L.M., Timm, C.D.
 10 **Genetic similarity between pathogenic microorganisms' strains isolated from milk and wild birds**
 11 **captured in these establishments.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Inspeção
 12 de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas
 13 (UFPel), Campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail:
 14 thamiris.p@outlook.com

15 The genetic similarity between pathogenic strains isolated from feces of dairy cattle, milk from
 16 these same animals, feces from wild birds captured around dairy farms and surface samples from hand
 17 milkers was verified. The microorganisms studied were *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*,
 18 *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. The capture of the birds was done with mist nets, placed in strategic
 19 places in the properties. Fecal samples were obtained by inserting sterile swabs into the rectum of the cows
 20 and into the sewer of the captured birds. Milk samples were collected at the beginning of milking, after
 21 despising the first three jets, and the milk was filled into sterile flasks. During the milking process, samples
 22 were collected from the surface of the milkers' hands. The resistance of *S. aureus* to methicillin was tested,
 23 as well as the similarity between the molecular profiles of the isolates of the same species, through rep-PCR.
 24 Samples were collected in 6 dairy farms, yielding 88 cow feces samples and the same number of milk
 25 samples, from the same cows, 11 milking hand surface samples and feces samples from 106 wild birds. *S.*
 26 *aureus* was isolated from 4 *Turdus rufiventris* and 1 *Cyanoloxia brissonii*, of which 4 (80%) were MRSA. *Y.*
 27 *enterocolitica* was isolated from 2 *T. rufiventris* and 1 *Columbina picui*, totalizing 2.8% of the positive
 28 samples. Of the feces samples from lactating cows, 6 (54.5%) were contaminated by *S. aureus*, of which 5
 29 (83.3%) were MRSA, and 1 (1.1%) by *Y. enterocolitica*. Of the milk samples, 1 (1.1%) was positive for *Y.*
 30 *enterocolitica* and 8 (53.3%) for *S. aureus*, and 6 (75%) were identified as MRSA. There was no isolation of
 31 *Salmonella* and *Listeria*. In addition, *S. aureus* isolated from feces of *T. rufiventris* and samples of milk and
 32 feces from two cows had their molecular profiles described as identical, indicating the occurrence of cross-
 33 contamination between domestic animals and birds. In the specific case of MRSA, considering the origin of
 34 the resistance developed by these strains, it can be concluded that the initial contamination went from
 35 humans or domestic animals to the wild ones, although these could later serve as disseminators.

36 INDEX TERMS: wild birds, dairy farm, pathogenic microorganisms, molecular profile similarity.

37
 38
 39
 40 ¹Recebido em.....

41 Aceito para publicação em

42 ²Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária Preventiva,
 43 Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, Rio
 44 Grande do Sul, Brasil. *Autor para correspondência: thamiris.p@outlook.com

45
 46 **RESUMO.**–[**Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados em**
 47 **leitarias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos.**] A similaridade genética entre cepas
 48 patogênicas isoladas de fezes de bovinos leiteiros, leite destes mesmos animais, fezes de aves silvestres
 49 capturadas no entorno das propriedades leiteiras e amostras de superfície da mão dos ordenhadores foi
 50 verificada. Os micro-organismos estudados foram *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*
 51 e *Listeria monocytogenes*. A captura das aves foi feita com redes de neblina, colocadas em locais estratégicos

nas propriedades. As amostras de fezes foram obtidas através da inserção de zaragatoas estéreis no reto das vacas e na cloaca das aves capturadas. As amostras de leite foram coletadas no início da ordenha, após desprezar os três primeiros jatos, e o leite foi acondicionado em frascos estéreis. Durante o processo de ordenha foi realizada a coleta de amostras da superfície das mãos dos ordenhadores. A resistência de *S. aureus* à meticilina foi testada, assim como a similaridade entre os perfis moleculares dos isolados da mesma espécie, através de rep-PCR. Foram feitas coletas em 6 propriedades leiteiras, obtendo-se 88 amostras de fezes de vaca e o mesmo número de amostras de leite, das mesmas vacas, 11 amostras de superfície de mão de ordenhador e amostras de fezes de 106 aves silvestres. *S. aureus* foi isolado de 4 *Turdus rufiventris* e 1 *Cyanoloxia brissonii*, dos quais, 4 (80%) eram MRSA. *Y. enterocolitica* foi isolada de 2 *T. rufiventris* e 1 *Columbina picui*, totalizando 2,8% das amostras positivas. Das amostras de fezes das vacas em lactação, 6 (54,5%) estavam contaminadas por *S. aureus*, dos quais 5 (83,3%) eram MRSA, e 1 (1,1%) por *Y. enterocolitica*. Das amostras de leite, 1 (1,1%) foi positiva para *Y. enterocolitica* e 8 (53,3%) para *S. aureus*, sendo 6 (75%) identificados como MRSA. Não houve isolamento de *Salmonella* e *Listeria*. Além disso, em uma mesma propriedade, *S. aureus* isolados de fezes de um *T. rufiventris* e de amostras de leite e fezes de duas vacas tiveram seus perfis moleculares descritos como idênticos, indicando a ocorrência de contaminação cruzada entre os animais domésticos e as aves silvestres. No caso específico de MRSA, considerando a origem da resistência desenvolvida por estas cepas, pode-se concluir que a contaminação inicial partiu de humanos ou animais domésticos para os silvestres, embora estes possam posteriormente servir de disseminadores.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: aves silvestres, leiteiras, micro-organismos patogênicos, similaridade de perfil molecular.

INTRODUÇÃO

O Brasil, com 8.547.403,5 km de área, se encontra entre os países de maior riqueza de fauna do mundo. Em relação às aves, ocupa a 3ª posição com cerca de 1.677 espécies, sendo 1.524 residentes e 153 visitantes (Giovanini 2002, Godoy e Matushima 2010). As interações entre espécies selvagens e gado têm sido implicadas em danos econômicos, riscos à saúde dos animais domésticos e silvestres e riscos à saúde pública. As aves silvestres são consideradas reservatórios de diversos micro-organismos patogênicos e, devido à sua grande mobilidade, podem atuar como propagadoras para animais domésticos utilizados para consumo humano, através da contaminação direta ou de alimentos e água. Há poucos trabalhos sobre a microbiota de aves silvestres, particularmente no Brasil, sendo a maioria realizada com animais oriundos do tráfico e/ou cativo (Tsiodras et al. 2008, Summa et al. 2018).

As fazendas leiteiras são conhecidas por abrigar vários micro-organismos patogênicos de origem alimentar que podem circular dentro do rebanho. Alguns desses patógenos não causam doenças observáveis em bovinos, dificultando a detecção de animais portadores (Van Kessel et al. 2011, Haley et al. 2015, Kim et al. 2018). O leite possui uma variedade de nutrientes que o tornam um produto amplamente consumido e um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de agentes patogênicos e deteriorantes (Germano e Germano 2015, Timm et al. 2017). Apesar do processo de pasteurização, a qualidade e a segurança do leite cru são importantes na redução do risco de doenças transmitidas por alimentos (DTA) associadas ao leite, pois o produto cru é o ponto de partida da cadeia de produção/consumo do leite (Latorre et al. 2010).

Staphylococcus coagulase positiva são habitantes usuais da pele, mucosas, trato respiratório superior e intestino do homem. Também são um dos principais agentes etiológicos de mastite bovina (Doyle e Buchanan 2012) e pode ser encontrado no intestino de animais domésticos e silvestres (Brittingham et al. 1988). A partir da década de 1960, o uso frequente das penicilinas penicilinase-estáveis, favoreceu o surgimento de cepas resistentes, denominadas *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA), que têm sido responsáveis por infecções nosocomiais (Sousa et al. 2014) de difícil tratamento (Smith et al. 2017). *Salmonella* é o micro-organismo mais comumente associado a diarreias bacterianas em humanos e a transmissão ocorre pelo consumo de produtos de origem animal que estejam contaminados com esta bactéria (Timm et al. 2016). Segundo Millán et al. (2004), as aves são importantes reservatórios deste micro-organismo, sendo um risco potencial para humanos e outros animais, podendo, inclusive, contaminar os produtos resultantes da criação de animais domésticos, como o leite. *Yersinia enterocolitica* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza e causa infecções entéricas de caráter zoonótico no homem. Os animais destinados ao abate, os de estimação e os silvestres podem ser reservatórios do agente. É encontrada no intestino de diferentes espécies animais, sendo que os suínos ocupam lugar de destaque como portadores crônicos dos sorotipos mais comumente implicados na infecção humana (Germano e Germano, 2015). *Listeria monocytogenes* acomete diversas espécies animais, além do homem, sendo isolada a partir de mais de 40 espécies de mamíferos domésticos e silvestres, e quase 20

111 espécies de aves. Pode ser introduzida no leite de conjunto através da contaminação fecal durante o
 112 processo da ordenha e as vacas podem se infectar através do consumo de silagem contaminada, água, outros
 113 materiais ambientais, vida selvagem e/ou de exposições às fezes de outros bovinos que estejam eliminando
 114 esta bactéria (Kim et al. 2018).

115 A transmissão dos patógenos dos animais silvestres para os humanos e animais domésticos e vice-
 116 versa representa um risco de ocorrência de enfermidades e de disseminação desses micro-organismos.
 117 Portanto, este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de cepas de micro-organismos patogênicos
 118 molecularmente similares em fezes e leite de vacas leiteiras em produção, mãos dos ordenhadores e fezes
 119 de aves silvestres capturadas nos mesmos estabelecimentos, e verificar a presença de MRSA nos isolados.

120

121

122

MATERIAL E MÉTODOS

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

Coleta das amostras. Durante o período de estudo, foram coletadas amostras de fezes de vacas leiteiras em produção, de leite e das mãos de ordenhadores de seis estabelecimentos leiteiros, localizados no sul do Rio Grande do Sul. Também foi feita coleta de amostras de fezes de aves silvestres capturadas nas mesmas propriedades. As coletas foram realizadas em visitas semanais, em três ou quatro semanas consecutivas. Cada visita era constituída pela tarde de um dia e a manhã do dia seguinte.

As aves foram capturadas com duas redes de neblina de 12 metros colocadas em locais estratégicos no entorno da leitaria. O esforço de captura foi de oito horas, sendo quatro no primeiro dia da coleta, ao entardecer, e os outros quatro no dia seguinte, ao amanhecer, ambos momentos de maior movimentação das aves. As fezes foram coletadas através da inserção de zaragatoas estéreis nas cloacas dos animais. Após a coleta de fezes, as aves foram identificadas taxonomicamente quanto ao gênero e espécie, de acordo com a Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (Piacentini et al. 2015), marcadas discretamente no dorso com tinta inodora não tóxica (All-Weather, U.S.A.), de modo a serem identificadas no caso de recaptura, evitando assim a duplicação de amostras, e imediatamente soltas.

As amostras de fezes das vacas em lactação (até 15 animais por estabelecimento) foram obtidas através da inserção de zaragatoa estéril no reto dos animais. Logo após o processo de higienização, pré-dipping e secagem dos tetos, 100 mL de leite foram coletados com uso de vasilhames estéreis dos mesmos animais que foram coletadas as fezes.

Para a coleta de amostras das mãos dos ordenhadores, realizada durante a ordenha, as zaragatoas foram friccionadas em movimentos giratórios da parte inferior da palma direita, até a extremidade dos dedos, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo. Já nas bordas, a zaragatoa foi passada em movimentos de vai-e-vem avançando em um dos lados da mão, onde a linha do punho se inicia, passando entre os dedos e pelo outro lado da mão até o punho. Após a obtenção das amostras, as zaragatoas foram mantidas úmidas por imersão em 4 mL de água peptonada a 0,1% (APHA 2001).

As amostras de fezes coletadas foram encaminhadas ao laboratório em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia). Todas as amostras foram enviadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo reutilizável.

Obtenção dos isolados. Para pesquisa de *Salmonella*, as zaragatoas foram acondicionadas em tubos de ensaio com 10 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia, Estados Unidos) e 25 mL do leite foi adicionado a 225 mL de APT. O material foi incubado para pré-enriquecimento e demais procedimentos para pesquisa de *Salmonella* conforme recomendações da U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Andrews et al. 2018).

Para o isolamento e identificação de *Yersinia*, foi realizada semeadura por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia) com a utilização da zaragatoa previamente obtida e incubação a 30°C por 24h. Para análise das amostras de leite, 25 mL foram adicionados a 225 mL de APT, para pré-enriquecimento por 30 dias a 4°C. Após, 1 mL do pré-enriquecimento foi adicionado a 100 mL de caldo PSTA, composto por 1g de peptona A (Acumedia), 1g de Sacarose (Synth, Brasil), 3g de TRIS hidroximetil aminometano (Ludwig Biotec, Brasil), 0,0125g de Verde Brilhante (Synth), 0,192g de Azida de Sódio (Synth) e água destilada qsp 1 L, suplementado com Ampicilina (Sigma Aldrich, EUA) na concentração de 5mg/L e incubado a 30°C por 48h. Depois deste período, foi feita semeadura em Ágar MacConkey e incubação a 30°C por 24h. De três a cinco colônias lactose negativa de cada amostra foram semeadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e, após incubação a 37°C por 24h, foi feita identificação da espécie *Y. enterocolitica* de através da verificação de motilidade no ágar SIM (Micromed, São Paulo, Brasil), como descrito por FDA (Weagant e Feng 2016).

A determinação da presença de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada conforme descrito por FDA (Bennete e Lancette 2017), com modificações. As zaragatoas com as amostras de fezes e uma alíquota do leite foram diretamente semeadas em superfície de ágar Baird-Parker (Himedia) e incubadas a

170 37°C por 48h. De três a cinco colônias típicas e atípicas foram inoculadas em BHI e incubadas a 37°C por
 171 24h para realização da prova da coagulase, que consiste na mistura de 0,3 mL de cada cultura com 0,3 mL
 172 de plasma de coelho e incubação a 37°C por 6h para observação de coagulação.

173 Para pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi feito enriquecimento primário das zaragatoas com as
 174 fezes em 10 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (UVM, *University Vermont Medium*) e 25 mL de
 175 leite em 225 mL de caldo UVM, incubados a 30°C por 24h e os demais procedimentos conforme Timm et al.
 176 (2016).

177 Culturas em BHI dos isolados de *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *L. monocytogenes* e
 178 *Y. enterocolitica* foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -70°C, e recuperadas
 179 quando necessário.

180

181 **Avaliação da sensibilidade à meticilina.** Para avaliar a sensibilidade à meticilina foi realizada
 182 metodologia de disco-difusão, conforme Bauer e Kirby (1966), utilizando o antimicrobiano Cefoxitina 30 µg
 183 (CFO). A escolha do antimicrobiano foi realizada de acordo com CLSI (2015). Os isolados confirmados como
 184 *S. aureus* tiveram sua turbidez padronizada pela escala de McFarland em 0,5 e foram semeados em
 185 superfície de ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Itália), então, foi assentado o disco impregnado com o antibiótico.
 186 As placas foram incubadas a 37°C por 24h e os halos foram medidos. Foram considerados resistentes
 187 aqueles com halos inibitórios menores ou iguais a 21 mm e suscetíveis os isolados que apresentaram halos
 188 maiores ou iguais a 22 mm.

189

190 **Reação em cadeia da polimerase.** Os isolados de *Y. enterocolitica* foram confirmados pela técnica de PCR
 191 usando dois pares de *primers* (duplex-PCR), conforme Wannet et al. (2001). Cada 25 µL da mistura de reação
 192 continha os *primers* específicos para o gene *ail* (Quadro 1) na concentração de 160 nM e para o gene rRNA
 193 16S na concentração de 80 nM, 200 µM de cada nucleotídeo, 0,5U de Taq DNA polimerase, 1x de tampão, 2
 194 µL (20 ng) de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador a 94°C durante 5 minutos, seguido por 36
 195 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Uma extensão final foi
 196 feita a 72°C durante 7 minutos. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo,
 197 Brasil) para visualização em eletroforese em gel de agarose (Panreac Química SA, Barcelona, Espanha) a
 198 1,5%.

199

200 Quadro 1 – *Primers* utilizados na identificação de *Y. enterocolitica*

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Referência
A1	TTAATGTGTACGCTGGGAGTG	<i>ail</i>	425	Wannet et al. (2001)
A2	GGAGTATTCATATGAAGCGTC	rRNA 16S	330	Neubauer et al. (2000)
Y1	AATACCGCATAACGTCTTCG			
Y2	CTTCTTCTGCGAGTAACGTC			

201

202 A identificação das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* foi feita através de análise do DNA
 203 dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva através de multiplex-PCR, pesquisando a presença do
 204 gene *nuc* com uso dos *primers* representados no quadro 2. Foi utilizado o protocolo relatado por Sasaki et
 205 al. (2010). Cada reação de 50 µL continha 2 µL (20 ng) de DNA extraído, 2U de Taq DNA polimerase, 10 pmol
 206 de cada *primer*, 0,2 nM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e tampão de reação. A amplificação foi
 207 realizada a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1
 208 minuto, e extensão final a 72°C por 2 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em
 209 gel de agarose a 1%, conforme descrito anteriormente.

210 Quadro 2 - **Primers utilizados na identificação das espécies de *Staphylococcus***

Primer	Sequência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Espécie
au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	<i>nuc</i>	359	<i>S. aureus</i>
au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC			
in-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	<i>nuc</i>	430	<i>S. intermedius</i>
in-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC			
hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	<i>nuc</i>	793	<i>S. hyicus</i>
hy-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC			

211

212 **Perfis moleculares.** Os perfis moleculares dos isolados de *Y. enterocolitica* e *S. aureus* foram analisados
 213 através da técnica de reação em cadeia da polimerase com elemento repetitivo palindrômico (rep-PCR),
 214 fazendo uso do *primer* (GTG)₅ (Versalovic et al. 1994). As condições da rep-PCR foram as seguintes: 2,5 µL
 215 de DNA, 2 µL do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3', 12,5 µL de Master Mix (Qiagen, Alemanha) e
 216 8 µL de água para completar o volume da reação. Para a amplificação foram realizados 1 ciclo de 94°C por
 217 5 minutos, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto e 60°C por 5 minutos, e
 218 finalmente 1 ciclo de 60°C por 16 minutos. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões
 219 amplificadas, os produtos da rep-PCR foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de
 220 agarose 2%.

221 Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas, sob
 222 número de parecer 0978-2016 e a captura das aves silvestres foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de
 223 Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob número 57 261-1.

224

225 RESULTADOS

226 Foram feitas coletas em seis propriedades leiteiras, obtendo-se 88 amostras de fezes de vaca e o
 227 mesmo número de amostras de leite, 11 amostras de mãos de ordenhador e 106 amostras de fezes de aves
 228 silvestres que estão discriminadas no quadro 3 por espécie. Neste total, está incluída uma amostra de fezes
 229 obtida de um ninho de *Passer domesticus* encontrado em uma sala de ordenha.

230

231 Quadro 3 - **Aves silvestres capturadas para pesquisa de *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *L.*
 232 *monocytogenes* e *S. aureus* nas fezes**

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	QUANTIDADE
Sabiá-laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i> ^{a, b}	34
Rolinha-picuí	<i>Columbina picui</i> ^b	14
Rolinha-roxa	<i>Columbina talpacoti</i>	12
João-de-barro	<i>Furnarius rufus</i>	12
Asa-de-telha	<i>Agelaioides badius</i>	7
Tico-tico	<i>Zonotrichia capensis</i>	5
Canário-da-terra	<i>Sicalis flaveola</i>	3
Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	3
Sabiá-poca	<i>Turdus amaurochalinus</i>	3
Bem-te-vi	<i>Pitangus sulphuratus</i>	2
Pardal	<i>Passer domesticus</i>	2
Sanhaço-cinzento	<i>Tangara sayaca</i>	2
Andorinha-do-campo	<i>Progne tapera</i>	1
Azulão	<i>Cyanoloxia brissonii</i> ^a	1
Pica-pau-carijó	<i>Colaptes melanochloros</i>	1
Pintassilgo	<i>Spinus magellanicus</i>	1
Suiriri-cavaleiro	<i>Machetornis rixosa</i>	1
Tapicuru	<i>Phimosus infuscatus</i>	1

233 ^a Espécies das quais foi isolado *S. aureus*.

234 ^b Espécies das quais foi isolada *Y. enterocolitica*.

235 Das amostras obtidas das fezes de aves silvestres capturadas e do ninho, 5/106 (4,7%) foram
 236 positivas para *S. aureus*, as quais eram oriundas de *Turdus rufiventris* (4) e *Cyanoloxia brissonii* (1). Destes,
 237 4 (80%) foram classificados como MRSA, sendo 3 de *T. rufiventris* e 1 de *C. brissonii*. Também houve
 238 isolamento de *Y. enterocolitica* de 3/106 (2,8%) das amostras, as quais eram provenientes de *T. rufiventris*
 239 (2) e de *C. picui* (1).

240 Das fezes de vaca houve isolamento de *Y. enterocolitica* em 1/88 (1,1%) e *S. aureus* em 6/88 (6,8%),
 241 dos quais 5 (83,3%) foram classificados como MRSA.

242 Das amostras de leite coletadas, 1/88 (1,1%) foram positivas para *Y. enterocolitica* e 8/88 (9,1%)
 243 para *S. aureus*, dos quais 6/8 (75%) foram classificados como MRSA.

244 Foram coletadas 11 amostras de superfície de mão de ordenhador e houve isolamento de 1/11
 245 (9,1%) de MRSA.

246 Em uma mesma propriedade, os isolados de *S. aureus* obtidos das amostras de fezes de uma ave
 247 silvestre (*T. rufiventris*) e das amostras de fezes e leite de duas vacas apresentaram perfil molecular idêntico.

248 Não houve isolamento de *Salmonella* e *L. monocytogenes* das amostras analisadas no trabalho.

249

250

DISCUSSÃO

251 A transmissão de micro-organismos patogênicos entre aves silvestres, vacas em produção e leite
 252 foi demonstrada a partir da verificação da similaridade genética dos isolados, uma vez que *S. aureus* com o
 253 mesmo perfil molecular foi isolado das fezes de *T. rufiventris* e das fezes e leite de duas vacas.

254 As áreas de armazenamento de estrume fornecem oportunidades adicionais de forrageamento para
 255 aves e outros animais silvestres, porque o esterco geralmente contém grãos ou outros alimentos que foram
 256 descartados durante a alimentação ou foram defecados por gado (Cernicchiaro et al. 2012) e assim, estas
 257 aves podem se contaminar, disseminando os micro-organismos eliminados pelas vacas, contaminando
 258 animais silvestres e ambiente. Pradham et al. (2009) indicaram que agentes endêmicos de doenças
 259 infecciosas com potencial zoonótico são comuns em animais leiteiros e em seus ambientes, o que pode gerar
 260 uma contaminação entre o rebanho, com a disseminação desses agentes e, até mesmo, contaminação
 261 ambiental e de animais silvestres que entrem em contato com o gado. As aves silvestres, por sua vez, quando
 262 contaminadas podem ser fontes de contaminação para as vacas, ocorrendo a situação inversa. No nosso
 263 estudo, não é possível afirmar em que sentido se deu a transmissão, se das aves silvestres para as vacas em
 264 produção ou no sentido contrário, com exceção do caso específico de MRSA. As primeiras cepas de *S. aureus*
 265 que desenvolveram resistência à meticilina foram isoladas de hospitais humanos (Pearman et al. 1985),
 266 posteriormente sendo também isoladas de trabalhadores rurais, principalmente ordenhadores, e leite
 267 (Witte 2000, Feßler et al. 2010, Lim et al. 2013). Portanto, pode-se concluir que os humanos tenham sido a
 268 fonte original de contaminação para os animais de produção e que as aves silvestres tenham sido
 269 contaminadas por humanos ou animais domésticos, provavelmente através das suas fezes, e
 270 posteriormente disseminado os micro-organismos. Smith et al. (2017), no Reino Unido, e Wardyn et al.
 271 (2012), nos Estados Unidos, após isolarem MRSA de aves silvestres, afirmaram que *S. aureus* é transportado
 272 por vários animais silvestres comumente encontrados entre os humanos. No Brasil, a ocorrência de *S.*
 273 *aureus* em aves silvestres ainda é muito pouco estudada. Branconaro et al. (2015) relataram a presença da
 274 bactéria no intestino de 3/253 (1,2%) das aves silvestres que estudaram no estado de São Paulo. Estes
 275 autores não pesquisaram a resistência dos isolados à meticilina, nem mencionam as espécies portadoras. O
 276 nosso estudo é o primeiro registro da ocorrência de *S. aureus* em *T. rufiventris* e *C. brissonii* e também o
 277 primeiro em registrar a ocorrência de MRSA em aves silvestres no Brasil.

278 A presença da mesma cepa de *S. aureus* no leite e nas fezes da mesma vaca indica que houve
 279 contaminação da glândula mamária pelas fezes. Esse fato ressalta a importância dos cuidados higiênicos no
 280 manejo dos animais e da ordenha, de forma a prevenir a contaminação da glândula mamária por micro-
 281 organismos patogênicos de origem intestinal. *S. aureus* é o patógeno mais frequentemente isolado de leite
 282 cru (Zecconi & Hahn 2000). Essa bactéria está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária
 283 dos bovinos leiteiros, como demonstrado por André et al. (2008), em Goiás, Mota et al. (2012), em
 284 Pernambuco, Costa et al. (2013), em Minas Gerais e Langoni et al. (2015), em São Paulo, o que explica o seu
 285 isolamento no nosso estudo das amostras oriundas das vacas, sejam fezes ou leite, e também dos isolados
 286 obtidos a partir de fezes de aves silvestres e mãos de ordenhadores.

287 De acordo com Witte (2000) e Moon et al. (2007), a crescente resistência dos micro-organismos
 288 isolados de rebanhos leiteiros a antibióticos se deve ao uso incorreto de β -lactâmicos para infusão
 289 intramamária e à presença de genes de resistência em células bacterianas que acabam sendo selecionadas
 290 com a aplicação dos antibióticos. Mesmo meticilina não sendo o medicamento comumente utilizado para
 291 tratamento de mastite, a resistência a classe dos β -lactâmicos confere esse mecanismo de proteção também
 292 frente a este antibiótico, que pertence a essa mesma classe (Silva et al. 2018).

293 O isolamento de MRSA obtido no nosso trabalho a partir da mão de um ordenhador é
 294 particularmente importante, uma vez que ele entra em contato com os tetos das vacas e com o ambiente da
 295 sala de ordenha, podendo carrear estes micro-organismos resistentes a diversos locais, incluindo a própria
 296 família. Moon et al. (2007) isolaram MRSA da mão de ordenhadores e de vacas em lactação e afirmaram que
 297 a transferência ocorreu dos seres humanos para os animais, os quais disseminaram cepas pelo rebanho. O
 298 ambiente também pode ser uma fonte de infecção, como relatado por Silva et al. (2018), que afirmaram que
 299 este micro-organismo pode sobreviver durante meses no ambiente, desde que as condições para sua
 300 sobrevivência, como temperatura e umidade, sejam favoráveis.

301 Todas as aves silvestres capturadas são consideradas endêmicas na região de coleta, têm hábitos
 302 alimentares e comportamentais semelhantes, vivem em matas, mas conseguem viver em consonância com
 303 outros animais, em ambientes de produção e até mesmo em ambientes mais urbanizados. A espécie que
 304 teve maior casuística, tanto por albergar *S. aureus* e *Y. enterocolitica*, como por ser portadora da mesma
 305 cepa isolada de fezes e leite de vaca foi *T. rufiventris*. Esta espécie tem o hábito de ficar no solo, procurando
 306 invertebrados e frutas para se alimentar, vive na borda de matas e em áreas abertas arborizadas, o que leva
 307 esses animais a viverem em parques urbanos e até jardins (Timm e Timm, 2016), estando em contato com
 308 o ambiente em que animais de produção e companhia vivem, bem como com os seres humanos.

309 Outros autores também acharam *Y. enterocolitica* nas fezes de animais silvestres. De 218 zaragatoas
 310 com conteúdo fecal obtidas de aves migratórias, Foti et al. (2011), na Itália, obtiveram 183 isolados de
 311 diferentes espécies de enterobactérias e, dessas, 8 (4,4%) eram *Y. enterocolitica*. Diferentemente do nosso
 312 estudo, Dias et al. (2014) não isolaram este micro-organismo de aves capturadas em aviários localizados no
 313 sul do Brasil. Já, Niskanen et al. (2003), na Suécia, e Najdenski et al. (2018), na Bulgária, isolaram *Y.*
 314 *enterocolitica* das fezes de aves migratórias, obtendo 34/673 (5,1%) e 26/468 (5,6%) de positividade,
 315 respectivamente. No Japão, Kato et al. (1985) avaliaram fezes de aves silvestres que eram frequentemente
 316 observadas nos grãos que serviam de alimentação para animais de produção e obtiveram 21/500 (4,2%)
 317 de positividade para *Y. enterocolitica*. Rouffaer et al. (2017), na Bélgica, isolaram *Y. enterocolitica* de
 318 103/329 (31,3%) das fezes de *Passer domesticus* capturados em regiões urbanizadas e área rural. Estes
 319 autores inferiram que a fauna silvestre é cada vez mais reconhecida como um vetor importante, ou potencial
 320 reservatório, para vários patógenos humanos, como o micro-organismo isolado. Também especularam que
 321 a coexistência das aves silvestres com animais de produção pode contribuir para a ocorrência de *Y.*
 322 *enterocolitica* em aves silvestres, já que os animais de produção podem carrear-las e através das fezes
 323 contaminar o ambiente e as aves.

324 Assim como no nosso estudo, *Y. enterocolitica* já foi isolada em amostras de leite cru em outros
 325 trabalhos, como os de Tavares et al. (2017), no Brasil, Rahimi et al. (2014) e Jamali et al. (2015), ambos no
 326 Irã, Darwish et al. (2015), no Egito, e Bonardi et al. (2018), na Itália. O isolamento deste micro-organismo
 327 em leite cru ressalta o papel do leite como importante veículo propagador de *Y. enterocolitica*, com
 328 consequentes riscos para quem consome esse alimento contaminado.

329 Semelhantemente ao nosso trabalho, Liang et al. (2015), na China, obtiveram *Y. enterocolitica* de
 330 18/648 (2,78%) das amostras de fezes de gado que analisaram. Também Fukushima et al. (1983), no Japão,
 331 isolaram o micro-organismo de 6/618 (0,7%) das amostras de fezes de bovinos leiteiros estudadas. Bullians
 332 (2011), na Nova Zelândia, diferentemente dos resultados encontrados no nosso estudo e nos trabalhos dos
 333 autores anteriormente citados, não obtiveram isolamento de *Y. enterocolitica* de fezes de bovinos.

334 No nosso estudo, não houve isolamento nem de *Salmonella*, nem de *L. monocytogenes* das amostras
 335 analisadas. Embora a ocorrência destes micro-organismos em fezes e leite de vacas não seja raro (Fleming
 336 et al., 1985, Pradham et al., 2009, Halley et al., 2015, Owusu-Kwarteng et al., 2018), poucos são os trabalhos
 337 relatando o seu isolamento de aves silvestres. Pedersen et al. (2006), nos Estados Unidos, Alley et al. (2011),
 338 na Nova Zelândia, Dias et al. (2014) e Cunha et al. (2016), ambos no Brasil, isolaram *Salmonella* de fezes de
 339 aves silvestres. Yoshida et al. (2000), no Japão, e Hellström et al. (2007), na Finlândia, isolaram *L.*
 340 *monocytogenes* também de fezes de aves silvestres. Das espécies que albergavam algum dos dois patógenos
 341 analisadas nesses trabalhos, apenas *S. flaveola* (Dias et al. 2014) e *P. coronata* (Cunha et al., 2016) foram
 342 capturadas no nosso estudo. Entretanto, os indivíduos amostrados não apresentaram nenhum dos micro-
 343 organismos pesquisados.

344 Segundo Van Kessel et al. (2011), apesar dos esforços consideráveis para estabelecer sistemas e
 345 protocolos de ordenha higiênicos, a contaminação fecal é praticamente inevitável e, portanto, o leite está
 346 em risco de contaminação com qualquer patógeno presente nas fezes ou no ambiente da fazenda. Sendo
 347 assim, é necessário que este alimento seja produzido da forma higiênica, em salas de ordenha que não
 348 permitam o ingresso de animais estranhos, tanto domésticos como silvestres, que o rebanho leiteiro seja
 349 constantemente monitorado quanto aos patógenos presentes e também que o leite sofra tratamento
 350 térmico para seu consumo, para que assim este alimento não seja fonte de contaminação de micro-
 351 organismos patogênicos para quem o consome.

CONCLUSÕES

S. aureus isolados de leite e fezes de vacas em lactação e de aves silvestres apresentaram idêntico perfil molecular, demonstrando a ocorrência da transmissão deste micro-organismo entre aves silvestres, vacas em produção e leite. No caso específico de MRSA, considerando a origem da resistência desenvolvida por estas cepas, pode-se concluir que a contaminação inicial partiu de humanos ou animais domésticos para os silvestres, embora estes possam posteriormente servir de disseminadores.

T. rufiventris e *C. brissonii* podem ser portadores de *S. aureus*, inclusive de cepas resistentes à meticilina, e eliminá-las no ambiente. *T. rufiventris* pode também, assim como *C. picui*, albergar *Y. enterocolitica*, bactéria que também pode estar presente nas fezes de vacas em produção e no leite cru.

Além das aves silvestres, MRSA pode ser isolado de mão de ordenhador e de fezes e leite de vaca, o que representa um risco adicional, já que este micro-organismo apresenta resistência aos medicamentos comumente utilizados para tratamento de infecções em humanos e animais.

Agradecimentos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Declaração de conflito de interesse. Os autores declaram que não têm conflito de interesse de ordem financeira, comercial, política, acadêmica e pessoal.

REFERÊNCIAS

- Alley, M.R., Connolly, J.H., Fenwick, S.G., Mackereth, G.F., Leyland, M.J., Rogers, L.E., Haycock, M., Nicol, C. & Reed, C.E.M. 2011. An epidemic of salmonellosis caused by *Salmonella Typhimurium* DT 160 in wild birds and humans in New Zealand. *NZ Vet J.* 50(5):170-176.
- André, M.C.D.P.B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C. & Serafini, A.B. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control.* 19(2):200-207
- Andrews, W.H., Wang, H., Jacobson, A. & Hammack, T. *Salmonella*. In: U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual, 2018. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 02 ago. 2018.
- APHA – American Public Health Association. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed. Washington, APHA. 676p.
- Bauer, A.W. & Kirby, W.M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45: 493-496.
- Bennete, R.W. & Lancette, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual, 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>> Acesso em: 30 out. 2018.
- Bonardi, S., Le Guern, A.S., Savin, C., Pupillo, G., Bolzoni, L., Cavalca, M. & Pongolini, S. 2018. Detection, virulence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in bulk tank milk in Italy. *Int Dairy J.* 84:46-53.
- Branconaro, P., Saidenberg, A.B.S., Benites, N.R., Zuniga, E., Da Silva, A.M.J., Sanches, T.C., Swarg, T., Brandao, P.E. & Melville, P.A. 2015. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. *Microb Pathog.* 88:65-72.
- Brittingham, M.C., Temple, S.A. & Duncan, R.M. 1988. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. *J Wildl Dis.* 24:299-307.
- Bullians, J.A. 2011. *Yersinia* species infection of lambs and cull cows at an abattoir. *N Z Vet J.* 35(5):65-67.

- 411
412 Cernicchiaro, N., Pearl, D.L., McEwen, S.A., Harpster, L., Homan, H.J., Linz, G.M. & Lejeune, J.T. 2012.
413 Association of wild Bird density and farm management factors with the prevalence of *Escherichia coli* O 157
414 in dairy herds in Ohio (2007 – 2009). *Zoonoses Public Health*. 59(5):320–329.
415
- 416 CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility
417 testing, twentieth information supplement, document M100-S25. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.
418
- 419 Costa, G.M., Barros, R.A., Custódio, D., Pereira, U., Figueiredo, D.J. & Silva, N. 2013. Resistência a
420 antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil.
421 *Arq Inst Biol*. 80(3):297-302.
422
- 423 Cunha, M.P.V., Guimarães, M.B., Davies, Y.M., Milanelo, L. & Knobl, T. 2016. Bactérias Gram-negativas em
424 cardeais (*Paroaria coronata* e *Paroaria dominicana*) apreendidos do tráfico de animais silvestres. *Braz J Vet*
425 *Res An Sci*. 53(1):107–111.
426
- 427 Darwish, S.F., Asfour, H.A.E. & Allam, H.A. 2015. Incidence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia*
428 *pseudotuberculosis* in raw milk samples of different animal species using conventional and molecular
429 methods. *Alexandria J Vet Sci*. 44:174-185.
430
- 431 Dias, P.A., Wilsmann, D.E., Heinen, J.G., Corsini, C.D., Calabuig, C. & Timm, C.D. 2014. Primeiro relato de
432 *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário-da-terra
433 (*Sicalis flaveola*) silvestres. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 73(4):368–371.
434
- 435 Doyle, M.P. & Buchanan, R.L. 2012. Food microbiology: fundamentals and frontiers. 4^a ed. Washington, ASM
436 Press. 1138p.
437
- 438 Feßler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S. & Schwars, S. 2010. Characterization of methicillin-
439 resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob Chemother*. 65(4):619-
440 625.
441
- 442 Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier,
443 A., Broome, C.V. & Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis.
444 *N Engl J Med*. 312(7):404–407.
445
- 446 Foti, M., Rinaldo, D., Guercio, A., Giacobello, C., Aleo, A., de Leo, F., Fisichella, V. & Mammina, C. 2011.
447 Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island of Ustica
448 Sicily (Italy). *Avian Pathol*. 40(4):405–409.
449
- 450 Fukushima, H., Saito, K., Tsubokura, M., Otsuki, K. & Kawaoka, Y. 1983. Isolation of *Yersinia* spp. from bovine
451 feces. *J Clin Microbiol*. 18(4):981-982.
452
- 453 Germano, P.M.L. & Germano M.I.S. 2015. Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos: qualidade das matérias-
454 primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 5^a ed. Baurueri – São Paulo,
455 Editora Manoele. 1077p.
456
- 457 Giovanini, D. 2002 1^o Relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. Brasília: Rede Nacional de
458 Combate ao Tráfico de Animais–RENCTAS.
459
- 460 Godoy, S.N. & Matushima, E.R. 2010. A survey of diseases in passeriforme birds obtained from illegal wildlife
461 trade in São Paulo, Brazil. *J Avian Med Surg*. 24(3):199–209.
462
- 463 Haley, B.J., Sonnier, J., Schukken, Y.H., Karns, J.S. & Van Kessel, J.A.S. 2015. Diversity of *Listeria monocytogenes*
464 within a U.S. dairy herd, 2004 – 2010. *Foodborne Pathog Dis*. 12(10):844–850.
465
- 466 Hellström, S., Kiviniemi, K., Autio, T. & Korkeala, H. 2007. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in
467 Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. *J Appl Microbiol*.
468 104:883–888.

- 469 Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B. & Ismail, S. 2015. Prevalence, characterization, and antimicrobial
470 resistance of *Yersinia* species and *Yersinia enterocolitica* isolated from raw milk in farm bulk tanks. J Dairy
471 Sci. 98:798-803.
472
- 473 Kato, Y., Ito, K., Kubokura, Y., Maruyama, T., Kaneko, K. & Ogawa, M. 1985. Occurrence of *Yersinia*
474 *enterocolitica* in wild-living birds and Japanese serows. Appl Environ Microbiol. 49(1):198-200.
475
- 476 Kim, S.W., Haendinges, J., Keller, E.N., Myers, R., Kim, A., Lombard, J.E., Karns, J.S., Van Kessel, J.A.S. & Haley,
477 B.J. 2018. Genetic diversity and virulence profiles of *Listeria monocytogenes* recovered from bulk tank milk,
478 milk filters, and milking equipment from dairies in the United States (2002 to 2014). PLOS One. 13(5
479 e0197053):1-17.
480
- 481 Langoni, H., Guimarães, F.F., Costa, E.O., Joaquim, S.F. & Menozzi, B.D. 2015. Celularidade do leite e Unidades
482 Formadoras de Colônias nas mastites causadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa.
483 Pesq. Vet. Bras. 35(6):518-524.
484
- 485 Latorre, A.A., Van Kessel, J.A., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., Jayarao, B.M., Houser,
486 B.A., Daugherty, C.S. & Schukken, Y.H. 2010. Biofilm in milk equipment on a dairy farm as a potential source
487 of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. J Dairy Sci. 93(6):2792-2802.
488
- 489 Liang, J., Duan, R., Xia, S., Hao, Q., Yang, J., Xiao, Y., Qiu, H., Shi, G., Wang, S., Gu, W., Wang, C., Wang, M., Tian,
490 K., Luo, L., Yang, M., Tian, H., Wang, J., Jing, H. & Wang, X. 2015. Ecology and geographic distribution of *Y.*
491 *enterocolitica* among livestock and wildlife in China. Vet Microbiol. 178(1-2):125-131.
492
- 493 Lim, S.K., Nam, H.M., Jang, G.C., Lee, H.S., Jung, S.C. & Kimm, T.S. 2013. Transmission and persistence of
494 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment, and workers in dairy cattle farms.
495 Foodborne Pathog Dis. 10(8):731-736.
496
- 497 Millán, J., Aduriz, G., Moreno, B., Juste, R.A. & Barral, M. 2004. *Salmonella* isolates from wild birds and
498 mammals in the Basque Country (Spain). Rev Sci Tech (International Office of Epizootics). 23:905-911.
499
- 500 Mota, R.A., Medeiros, E.S., Santos, M.V., Pinheiro Júnior, J.W., Moura, A.P.B.L. & Coutinho, L.C.A. 2012.
501 Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de
502 Pernambuco (Brasil). Ci Anim Bras. 13(1):124-130.
503
- 504 Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y.H., Park, Y.S., Young Ho, Y.S., Joo, Y.S. & Koo, H.C.
505 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine
506 mastitis in Korea. J Dairy Sci. 90(3):1176-1185.
507
- 508 Najdenski, H., Dimova, T., Zaharieva, M.M., Nikolov, B., Petrova-Dinkova, G., Dalakchieva, S., Popov, K.,
509 Hristova-Nikolova, I., Zehtindjiev, P., Peev, S., Trifonova-Hristova, A., Carniel, E., Panferova, Y.A. &
510 Tokarevich, N.K. 2018. Migratory birds along the Mediterranean – Black Sea Flyway as carriers of zoonotic
511 pathogens. Can J Microbiol. 64(12):915-924.
512
- 513 Neubauer, H., Hensel, A., Aleksic, S. & Meyer, H. 2000. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the
514 Genus *Yersinia*. Syst Appl Microbiol 23(1):58-62.
515
- 516 Niskanen, T., Waldenstrom, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Olsen, B. & Korkeala, H. 2003. virF-positive *Yersinia*
517 *pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. Appl Environ Microbiol.
518 68(8):4670-4675.
519
- 520 Owusu-Kwarteng, J., Wuni, A., Akabanda, F. & Jespersen, L. 2018. Prevalence and characteristics of *Listeria*
521 *monocytogenes* isolated in raw milk, heated milk and nunu, a spontaneously fermented milk beverage, in
522 Ghana. Beverages. 4(40):1-10.
523
- 524 Pearman, J.W., Christiansen, K.J., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Metcalf, C., Donovan, F.P., Macey, K.L., Basset,
525 L.D., Powell, I.M., Green, J.M., Harper, W.E. & McKelvie, M.S. 1985. Control of methicillin-resistant
526 *Staphylococcus aureus* (MRSA) in an Australian metropolitan teaching hospital complex. Med J
527 Aust. 142(2):103-108.

- 528
529 Pedersen, K., Clark, L., Andelt, W.F. & Salman, M.D. 2006. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*
530 and *Salmonella enterica* in rock pigeons captured in Fort Collins, Colorado. *J Wildl Dis.* 42(1):46–55.
531
- 532 Piacentini, V.Q., Aleixo, A., Agne, C.E., Maurício, G.N., Pacheco, J.F., Bravo, G.A., Brito, G.R.R., Naka, L.N., Olmos,
533 F., Posso, S., Silveira, L.F., Betini, G.S., Carrano, E., Franz, I., Lees, A.C., Lima, L.M., Pioli, D., Schunck, F., Amaral,
534 F.R., Bencke, G.A., Cohn-Haft, M., Figueiredo, L.F., Straube, F.C. & Cesari, E. 2015. Lista comentada das aves
535 do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Rev Brasil Ornitol.* 23(2):91–298.
536
- 537 Pradhan, A.K., Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Wolfgang, D.R., Hovingh, E., Nelen, K.A., Smith, J.M., Whitlock, R.H.,
538 Fyock, T., Ladely, S., Fedorka-Cray, P.J. & Schukken, Y.H. 2009. Dynamics of endemic infectious diseases of
539 animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States. *J Dairy Sci.* 92:1811–
540 1825.
541
- 542 Rahimi, E., Sepehri, S., Dehkordi, F.S., Shaygan, S. & Momtaz, H. 2014. Prevalence of *Yersinia* species in
543 traditional and commercial dairy products in Isfahan Province, Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* 7(4):e9249.
544
- 545 Roufaer, L.O., Strubbe, D., Teyssier, A., Hudin, N.S., Abeele, A.N.V., Cox, I., Haesendonck, R., Delmée, M.,
546 Haesebrouck, F., Pasmans, F., Lens, L. & Martel, A. 2017. Effects of urbanization on host-pathogens
547 interactions, using *Yersinia* in house sparrows as a model. *Plos ONE.* 12(12:e0189509):1-15.
548
- 549 Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T. &
550 Hiramatsu, K. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. *J*
551 *Clin Microbiol.* 48(3):765–769.
552
- 553 Silva, J.G., Alcântara, A.M. & Mota, R.A. 2018. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à
554 meticilina: revisão de literatura. *Pesq Vet Bras.* 38(2):223-228.
555
- 556 Smith, J.C., Ferreira, A.M., Baak, J.H. & Burt, S.A. 2017. Antibiotic resistant bacteria in rodents, birds and
557 insects. In: 9th International conference on urban pests, Birmingham, UK, 9-12 July 2017. ICUP. 189–192.
558
- 559 Sousa, M., Silva, N., Igrejas, G., Silva, F., Sargo, R., Alegria, N., Benito, D., Gómez, P., Lozano, C., Gómez-Sanz, E.,
560 Torres, C., Caniça, M. & Poeta, P. 2014. Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp.
561 recovered from birds of prey in Portugal. *Vet Microbiol.* 171(3–4):436–440.
562
- 563 Summa, M., Henttonen, H. & Maunula, L. 2018. Human noroviruses in the faeces of wild birds and rodents –
564 New potential transmission routes. *Zoonoses Public Health.* 65(5):512–518.
565
- 566 Tavares, A.B, Souza, A.I.A., Dulac, C.F., Moreira, L.M., Domingues, L.S.P., Gonzalez, H.L., Cereser, N.D. & Timm,
567 C.D. 2017. Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite. *Arq Bras Med Vet*
568 *Zootec.* 69:483-490.
569
- 570 Timm, C.D. & Timm, V.F 2016. Aves do Extremo Sul do Brasil: guia de identificação. Pelotas, USEB. 3340.
571
- 572 Timm, C.D., Dias, P.A., Conceição, R.C.S., Lima, H.G. & Silveira, D.R. 2016. Mini atlas de microbiologia de
573 alimentos. Pelotas, Ed. do Autor. 83p.
574
- 575 Timm, C.D., Lima, H.G. & Cereser, N.D. 2017. Manual de técnicas microbiológicas em leite e derivados.
576 Pelotas, Ed. do Autor. 85p.
577
- 578 Tsiodras, S., Kelesidis, T., Kelesidis, I., Bauchinger, U. & Falagas, M.E. 2008. Human infections associated with
579 wild birds. *J Infect.* 56:83–98.
580
- 581 Van Kessel, J.A.S., Karns, J.S., Lombard, J.E. & Koprak, C.A. 2011. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria*
582 *monocytogenes* and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. *J*
583 *Food Prot.* 74(5):759–768.
584
- 585 Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. & Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria with
586 repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cel Bio.* 5:25–40.

- 587
588 Wannet, W.J.B., Reessink, M., Brunings, H.A. & Maas, H.M.E. 2001. Detection of Pathogenic *Yersinia*
589 *enterocolitica* by a Rapid and Sensitive Duplex PCR Assay. J Clin Microbiol. 39(12):4483–4486.
590
- 591 Wardyn, S.E., Kauffman, L.K. & Smith, T.C. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Iowa
592 wildlife. J Wildl Dis. 48(4):1069–1073.
593
- 594 Weagant, S.D. & Feng, P. 2016. *Yersinia enterocolitica*. In: U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological
595 analytical manual. Disponível em:
596 <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm072633.htm>. Acesso em: 30 ago.
597 2018.
598
- 599 Witte, W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment.
600 Intern J Antimic Agents. 14(4):321-325.
601
- 602 Yoshida, T., Sugimoto, T., Sato, M. & Hirai, K. 2000. Incidence of *Listeria monocytogenes* in wild animals in
603 Japan. J Vet Med Sci. 62(6):673–675.
604
- 605 Zecconi, A. & Hahn, G. 2000. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of IDF.
606 345:15–18.

Legendas das figuras

607

608

609 Quadro 1: *Primers* utilizados na identificação de *Y. enterocolitica*610 Quadro 2: *Primers* utilizados na identificação das espécies de *Staphylococcus*611 Quadro 3: Aves silvestres capturadas para pesquisa de *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes* e *S.*612 *aureus* nas fezes

4 Considerações Finais

Aves silvestres entram em contato direto e indireto com animais de produção, assim, caso venham a carrear micro-organismos patogênicos, podem contaminar os animais, transmitindo-os também para os ambientes por onde transitam. Esta contaminação pode ocorrer no sentido contrário, em que os animais de produção contaminam o ambiente e também as aves silvestres, o que pode ser demonstrado pelo isolamento de MRSA de aves silvestres.

T. rufiventris e *C. brissonii* podem ser portadores de *S. aureus*, inclusive MRSA, e eliminá-lo no ambiente. *T. rufiventris* e *C. picui* podem albergar e disseminar *Y. enterocolitica*. Esses mesmos micro-organismos também são encontrados em fezes e leite de vacas em produção. A informação sobre quais espécies silvestres podem ser portadoras de micro-organismos patogênicos é relevante, especialmente no caso de *S. aureus*, bactéria cuja transmissão entre animais domésticos, aves silvestres e alimento foi demonstrada no nosso estudo. MRSA foi isolado das mãos de um ordenhador, o qual pode carrear o micro-organismo para as vacas e até mesmo para o produto da ordenha, fazendo com que o leite seja contaminado e chegue na indústria com micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos.

A contaminação do leite por micro-organismos patogênicos pode ser evitada de várias formas para que essas bactérias não cheguem até o consumidor. Evitar o ingresso de outros animais além das vacas em lactação, sejam domésticos ou silvestres, na sala de ordenha é o ponto inicial de prevenção dessa contaminação. Manter hábitos higiênicos adequados e rigorosos na ordenha, monitorar o rebanho leiteiro quanto à presença de patógenos e fazer tratamento térmico no leite para consumo são também medidas importantes para o controle de *S. aureus* e *Y. enterocolitica*.

Referências

AKHTER, J.; HOUSSAIN, M. T.; ISLAM, M. T.; SIDDIQUE, M. P.; ISLAM, M. A. Isolation and identification of microflora from apparently healthy caged parrots of Dhaka Zoo of Bangladesh. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v.8, n.1, p.5-10, 2010.

ALLGAYER, M. C.; OLIVEIRA, S. J.; MOTTIN, V. D.; LOIKO, M. R.; ABILLEIRA, F.; GUEDES, N. M. R.; PASSOS, D. T.; WEIMER, T. A. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2542-2545, 2009.

BANCERZ-KISIEL, A.; SZCZERBA-TUREK, A.; PLATT-SAMORAJ, A.; MICHALCZYK, M.; SZWADA, W. A study of single nucleotide polymorphism in the *ystB* gene of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from various wild animal species. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.24, n.1, p.56-61, 2017.

BRASIL, Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2018. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em 23 jun. 2018.

BRITTINGHAM, M. C.; TEMPLE, S. A.; DUNCAN, R. M. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v.24, p.299-307, 1988.

CARLSON, J. C.; HYATT, D. R.; ELLIS, J. W.; PIPKIN, D. R.; MANGAN, A. M.; RUSSELL, M.; BOLTE, D. S.; ENGEMAN, R. M.; DELIBERTO, T. J.; LINZ, G. M. Mechanisms of antimicrobial resistant *Salmonella enterica* transmission associated with starling-livestock interactions. **Veterinary Microbiology**, v.179, n.1, p.60-68, 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 1015: Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2017.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Listeria (Listeriosis)**. 2018. Disponível em <https://www.cdc.gov/listeria/>. Acesso em 10 set. 2018.

CUNHA, M. P. V.; GUIMARÃES, M. B.; DAVIES, Y. M.; MILANELO, L.; KNOBL, T. Bactérias Gram-negativas em cardeais (*Paroaria coronata* e *Paroaria dominicana*) apreendidos do tráfico de animais silvestres. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.53, n.1, p.107-111, 2016.

DIAS, P. A.; WILSMANN, D. E.; HEINEN, J. G.; CORSINI, C. D.; CALABUIG, C.; TIMM, C. D. Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter spp.* isolados de Garibaldi (*Chrysomius ruficapillus*) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) silvestres. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.4, p.368-371, 2014.

FENLON, D. R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **Journal of Applied Bacteriology**, v.59, p.537-543, 1985.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GAUKLER, S. M.; LINZ, G. M.; SHERWOOD, J. S.; DYER, N. W.; BLEIER, W. J. *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild European starlings at a Kansas cattle feedlot. **Avian Diseases**, v. 53, n.4, p.544-551, 2009.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 5.ed. Baurueri – São Paulo: Editora Manoele, 2015. 1077p.

HALL, A. J.; SAITO, E. K. Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985-2004. **Journal of Wildlife Diseases**, v.44, n.3, p.585-593, 2008.

HELLSTRÖM, S.; KIVINIEMI, K.; AUTIO, T.; KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.883-888, 2007.

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v.40, n.4, p.639-659, 2004.

KAPPERUD, G.; ROSEF, O. Avian Wildlife Reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp.; and *Salmonella* spp. in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.2, p.375-380, 1983.

KIRK, J. H.; HOLMERC, C. A.; JEFFREY, J. S. Prevalence of *Salmonella* spp in selected birds captured on California dairies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.220, n.3, p.359-362, 2002.

KONICEK, C.; VODRÁŽKA, P.; BARTÁK, P.; KNOTEK, Z.; HESS, C.; RAČKA, K.; HESS, M.; TROXLER, S. Detection of Zoonotic Pathogens in Wild Birds in the Cross-Border Region Austria–Czech Republic. **Journal of Wildlife Diseases**, v.52, n.4, 850-861, 2016.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A. M.; HANDELAND, K. Wildlife as Source of Zoonotic Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.12, p.2067-2072, 2004.

LYAUTEY, E.; HARTMANN, A.; PAGOTTO, F.; TYLER K.; LAPEN, D. R.; WILKES, G.; PIVETEAU, P.; RIEU, A.; ROBERTSON, W. J.; MEDEIROS, D. T.; EDGE, T. A.; GANNON, B.; TOPP, E. Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. **Canadian Journal of Microbiology**, v.3, p.1158-1167, 2007.

MILLÁN, J.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; JUSTE, R. A.; BARRAL, M. *Salmonella* isolates from wild bird and mammals in the Basque Country (Spain). **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.23, p.905–911, 2004.

MONECKE, S.; GAVIER-WIDÉN, D.; HOTZEL, H.; PETERS, M.; GUENTHER, S.; LAZARIS, A.; LONCARIC, I.; MÜLLER, E.; REISSIG, A. Diversity of *Staphylococcus aureus* isolates in European wildlife. **PloS ONE**, v.11, n.12: e0168433, p.1-27, 2016.

PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N.; PACHECO, J. F.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; NAKA, L. N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; SILVEIRA, L. F.; BETINI, G. S.; CARRANO, E.; FRANZ, I.; LEES, A. C.; LIMA, L. M.; PIOLI, D.; SCHUNCK, F.; AMARAL, F. R.; BENCKE, G. A.; COHN-HAFT, M.; FIGUEIREDO, L. F.; STRAUBE, F. C.; CESARI, E. Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.23, n.2, p.91-298, 2015.

PLATT-SAMORAJ, A.; SYCZYŁO, K.; BANCERZ-KISIEL, A.; SZCZERBA-TUREK, A.; GIŻEJEWSKA, A.; SZWEDA, W. *Yersinia enterocolitica* strains isolated from beavers (*Castor fiber*). **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.18, n.2, p.449-451, 2015.

PRADHAM, A. K.; Van Kessel, J. S.; KARNIS, J. S.; WOLFGANG, D. R.; HOVINGH, E.; NELE, K. A.; SMITH, J. M.; WHITLOCK, R. H.; FYOCK, T.; LADELY, S.; FEDORKA-CRAY, P. J.; SCHUKKEN, Y. H. Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1811-1825, 2009.

REFSUM, T.; HANDELAND, K.; BAGGESEN, D. L.; HOLSTAD, G.; KAPPERUD, G. Salmonellae in Avian Wildlife in Norway from 1969 to 2000. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.11, p.5595-5599, 2002.

REFSUM, T.; VIKOREN, T.; HANDELAND, K.; KAPPERUD, G.; HOLSTAD, G. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella* typhimurium infection in passerine birds in Norway. **Journal of Wildlife Diseases**, v.39, n.1, p.64-72, 2003.

SILVA, A. M.; MARVULO, M. F. V.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.7, p.573-580, 2010.

SILVEIRA, D. R.; MILAN, C.; FERRASSO, M. M.; DIAS, P. A.; MORAES, T. P.; BANDARRA, P. M.; MINELLO, L. F.; TIMM C. D. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* isolated from wildlife animals of a rehabilitation center. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.9, p.1838-1843, 2018.

SKOV, M. N.; MADSEN, J. J.; RAHBEK, C.; LODAL, J.; JESPERSEN, J. B.; JORGENSEN, J. C.; DIETZ, H. H.; CHRIÉL, M.; BAGGESEN, D. L. Transmission of *Salmonella* between wildlife and meat-production animals in Denmark. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1558-1568, 2008.

SMITH, W. A.; MAZET, J. A.; HIRSH, D. C. *Salmonella* in California wildlife species: prevalence in rehabilitation centers and characterization of isolates. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.33, n.3, p.228-235, 2002.

SMITH, J. C.; FERREIRA, A. M.; BAAK, J. H.; BURT, S. A. **Antibiotic resistant bacteria in rodents, birds and insects**. In: 9th International conference on urban pests, Birmingham, UK, 9-12 July 2017. ICUP. 189-192, 2017.

STEELE, C. M.; BROWN, R. N.; BOTZLER, R. G. Prevalence of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the Pacific Coast of California and Washington, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v.41, n.4, p.735-744, 2005.

THAPALIYA, D.; DALMAN, M.; KADARIYA, J.; LITTLE, K.; MANSELL, V.; TAHA, M. Y.; GRENIER, D.; SMITH, T. C. Characterization of *Staphylococcus aureus* in Goose Feces from State Parks in Northeast Ohio. **EcoHealth**, v.14, p.303-309, 2017.

TIMM, C. D.; LIMA, H. G.; CERESER, N. D. Manual de técnicas microbiológicas em leite e derivados. **Pelotas, Ed. do Autor**. 85p. 2017.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. Microbiologia. **Porto Alegre, Artmed**. 12ªed. 964p. 2016.

VIDAL, A.; BALDOMÀ, L.; MOLINA-LÓPEZ, R. A.; MARTIN, M.; DARWICH, L. Microbiological diagnosis and antimicrobial sensitivity profiles in diseased free-living raptors. **Avian Pathology**. v.46, n.4, p.442-450, 2017.

YOSHIDA, T.; SUGIMOTO, T.; SATO, M.; HIRAI, K. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Wild Animals in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.6, p.673-675, 2000.

ZETOLA, N.; FRANCIS, J. S.; NUERMBERGER, E. L.; BISHAI, W. R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* an emergin threat. **The Lancet Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.275-286, 2005.

Anexos

Anexo I – Autorização para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57261-1	Data da Emissão: 29/03/2017 14:15	Data para Revalidação*: 28/04/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Similaridade entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados em leituras e de aves silvestres e micromamíferos capturados nestes estabelecimentos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Contato com os proprietários e coleta de amostras	02/2017	08/2019
2	PCR para identificação das espécies	04/2017	07/2019
3	Comparação das cepas por rep-PCR	05/2019	10/2019
4	Serotipagem de Salmonella	07/2019	09/2019
5	Avaliação dos resultados e redação do manuscrito	09/2019	12/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade das populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ogen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Todas as avos que vierem a óbito deverão ser tombadas na coleção ornitológica do Museu Carlos Ritter (UFPEL)
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Débora Rodrigues Silveira	colaboradora	077.109.669-00	90053959 ssp-PR	Brasileira
2	Thamiris Pereira de Moraes	colaboradora	016.799.250-11	9092644732 SJS-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PELOTAS	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36741826



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57261-1	Data da Emissão: 29/03/2017 14:15	Data para Revalidação*: 28/04/2018
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Similaridade entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados em leitões e de aves silvestres e micromamíferos capturados nestes estabelecimentos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

2	ARROIO GRANDE	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
3	CAPAO DO LEAO	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
4	MORRO REDONDO	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
5	ARROIO DO PADRE	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
6	SAO LOURENÇO DO SUL	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
7	CANGUCU	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
8	TURUCU	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
9	RIO GRANDE	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
10	CERRITO	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
11	PEDRO OSORIO	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal
12	JAGUARAO	RS	Propriedades rurais produtoras de leite	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres In situ	Columbidae, Furnariidae, Icteridae, Polioptilidae, Tityridae, Troglodytidae, Caviidae, Passeridae, Cardinalidae, Ploceidae, Scleruridae, Thraupidae, Fringillidae, Parulidae, Tyrannidae, Rhyncocyclidae, Cricetidae, Ammodramus humeralis, Mimidae, Vireonidae, Cuculidae, Hirundinidae, Muridae, Turtidae, Estrilidae, Zonotrichia capensis

Material e métodos

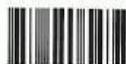
1	Amostras biológicas (Aves)	Feces
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Feces
3	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina
4	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
5	Método de marcação (Aves)	Corantes
6	Método de marcação (Outros mamíferos)	Outros métodos de marcação (corante)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36741826



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57261-1	Data da Emissão: 29/03/2017 14:15	Data para Revalidação*: 28/04/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Similaridade entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados em leitarias e de aves silvestres e micromamíferos capturados nestes estabelecimentos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36741826



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57261-1	Data da Emissão: 29/03/2017 14:15	Data para Revalidação*: 28/04/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Similaridade entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados em leiteiras e de aves silvestres e micromamíferos capturados nestes estabelecimentos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36741826



Página 4/4

Anexo II – Parecer consubstanciado do CEP

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Similaridade entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados em leiteiras e de aves silvestres e micromamíferos capturados nestes estabelecimentos.

Pesquisador: CLAUDIO DIAS TIMM

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70937617.2.0000.5317

Instituição Proponente: Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.177.856

Apresentação do Projeto:

O leite e seus derivados são um grupo de alimentos importante em casos e surtos de intoxicações causadas por *Staphylococcus coagulase positiva*. As espécies que apresentam interesse em microbiologia de alimentos por causarem intoxicações em decorrência da ingestão de enterotoxinas pré-formadas são *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*, estando presente nas vias respiratórias e pele, além de ser um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina e também ser encontrado no intestino de animais domésticos e silvestres. O gênero *Yersinia* reúne um conjunto de bactérias responsável por ampla variedade de patologias, tanto em saúde pública quanto em saúde animal. Os animais destinados ao abate, os de estimação e os silvestres, incluindo mamíferos, aves, répteis e pescados, podem ser reservatórios do agente. O leite é considerado o alimento mais completo que existe para o ser humano, entretanto possui destaque como responsável por surtos de gastroenterite. Embora todas as fases da obtenção e industrialização do leite sejam importantes para preservação da qualidade, a produção é de destacada relevância. Os problemas com a produção nas propriedades rurais podem iniciar com a ocorrência de processos inflamatórios nas glândulas mamárias das vacas leiteiras, grande parte dos quais não apresenta

Endereço: Rua Prof.Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.177.856

manifestação clínica visível, como também podem originar-se de falhas no processo higiênico durante a ordenha.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a similaridade de cepas de micro-organismos patogênicos isolados de bovinos leiteiros, leite e mãos de ordenhadores e de aves silvestres e micromamíferos capturados no estabelecimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Alergia a cloreto de sódio e/ou algodão.

Benefícios:

Saber se a pessoa carrega os micro-organismos estudados e as possibilidades de eliminá-los.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente irá verificar a similaridade das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* isoladas em leiteiras de aves silvestres, micromamíferos e vacas leiteiras, bem como do leite obtido desses animais. Através do isolamento desses micro-organismos das fezes do animais e também do leite. Após isolamento, destes será feita extração de DNA e técnicas biomoleculares para que seja observada a similaridade entre as cepas isoladas, podendo assim, determinar se são de origem em comum, ou não. Durante o período de estudo, serão coletadas amostras de fezes de vacas leiteiras, de leite e das mãos dos ordenhadores de 10 estabelecimentos leiteiros, localizados no sul do Rio Grande do Sul. Também será feita coleta de amostras de fezes de aves silvestres e micromamíferos capturados nas mesmas propriedades.

As coletas serão realizadas em duas visitas semanais consecutivas. Em cada visita, constituída pela tarde de um dia e a manhã do dia seguinte, serão coletadas amostras de fezes e de leite de 10 vacas em produção, da superfície das mãos dos ordenhadores e de fezes de aves silvestres e micromamíferos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Recomendações:

OK

Endereço: Rua Prof Araújo, 465 sala 301
 Bairro: Centro CEP: 96.020-360
 UF: RS Município: PELOTAS
 Telefone: (53)3284-4960 Fax: (53)3221-3554 E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.177.858

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	TCLE_CLAUDIO.doc	19/07/2017 07:47:29	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_862731.pdf	13/03/2017 09:43:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	13/03/2017 09:41:21	CLAUDIO DIAS TIMM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	12/03/2017 21:43:55	CLAUDIO DIAS TIMM	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	09/03/2017 11:54:38	CLAUDIO DIAS TIMM	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

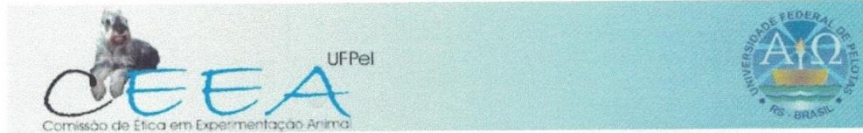
Não

PELOTAS, 19 de Julho de 2017

Assinado por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301
Bairro: Centro CEP: 96.020-360
UF: RS Município: PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 Fax: (53)3221-3554 E-mail: cep.famed@gmail.com

Anexo III – Comitê de Ética de Experimentação Animal



Pelotas, 04 de abril de 2017

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres de propriedades pluriativas e comparação dos perfis moleculares dos isolados**” registrada com o nº 23110.000978/2016-03, sob a responsabilidade de **Cláudio Dias Timm** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 27/03/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/04/2017 a 31/12/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus, Equus caballus, Sus scrofa, Gallus gallus, Ovis aries, Sicalis flaveola, Zonotrichia capensis, Columbina picui, Furnarius rufus, Columbina talpacoti</i>
Nº de animais	384 de cada espécie
Idade	variável
Sexo	ambos
Origem	Fazendas da Região Sul do Rio Grande do Sul
Nº Sisbio	52270-1
Método de captura	Aves – rede de neblina Micromamíferos – armadilhas do tipo Sheridan

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 0978-2016**).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:  Ciente em: 27/4 /2017