

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



Tese

**Bactérias relevantes em saúde única isoladas de animais silvestres e
domésticos: similaridade molecular e resistência a antimicrobianos**

Débora Rodrigues Silveira

Pelotas, 2021

Débora Rodrigues Silveira

Bactérias relevantes em saúde única isoladas de animais silvestres e domésticos: similaridade molecular e resistência a antimicrobianos

Tese 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 Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2021

S587b Silveira, Débora Rodrigues

Bactérias relevantes em saúde única isoladas de animais silvestres e domésticos: similaridade molecular e resistência a antimicrobianos / Débora Rodrigues Silveira; Cláudio Dias Timm, orientador. — Pelotas, 2021.

115 f.: il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

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

CDD : 636.0896959

Débora Rodrigues Silveira

Bactérias relevantes em saúde única isoladas de animais silvestres e domésticos:
similaridade molecular e resistência a antimicrobianos

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

Data da Defesa: 23/02/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Doutor em Ciência Veterinária pela Universidade de Wisconsin

Prof. Dr. Geferson Fischer
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Ana Maria Rui
Doutora em Ecologia pela Universidade Federal de Brasília

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família pelo apoio, principalmente aos meus pais, Vera e Antônio e ao meu filho Diogo por serem meus exemplos e minhas motivações diárias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Dias Timm e outros professores, que me servem como inspiração e que desde meus primeiros contatos laboratoriais durante a graduação me incentivaram e me instigaram a seguir a carreira acadêmica.

Às colegas da pós-graduação e aos alunos colaboradores, meu agradecimento pelo convívio, que foi tão prazeroso, e amizade. Sobretudo pelo auxílio durante a execução dos nossos projetos. Foram essenciais para a realização de todo o trabalho.

Ao meu namorado, Marcelo, pelo companheirismo, apoio e paciência.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-graduação em Veterinária por me oportunizarem o doutorado.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A todas pessoas que de alguma forma colaboraram em meus trabalhos.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”
George Bernard Shaw

Resumo

SILVEIRA, Débora Rodrigues. **Bactérias relevantes em saúde única isoladas de animais silvestres e domésticos: similaridade molecular e resistência a antimicrobianos.** Orientador: Cláudio Dias Timm. 2021. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Dados sobre animais silvestres portadores e disseminadores de bactérias são escassos pela dificuldade de se obter amostras. Mostram-se necessários mais estudos para determinação da importância das bactérias veiculadas por estes animais em saúde única. Nesta tese, objetivou-se determinar a ocorrência destas bactérias em fezes de aves silvestres, predominantemente passeriformes, de vida livre e animais domésticos da mesma propriedade, animais silvestres em reabilitação, por causas diversas, e morcegos que habitam construções humanas, bem como analisar características dos isolados. No primeiro estudo, foram coletadas amostras das fezes de aves silvestres de vida livre e de até cinco exemplares de cada espécie doméstica em uma propriedade pluriativa. No segundo, foram coletadas amostras de animais recebidos em um centro de reabilitação da fauna silvestre. No terceiro, foram amostrados morcegos, de espécies que se alojam em construções humanas, de diferentes abrigos na região do Campus Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram realizadas as pesquisas de *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. (apenas dos animais em reabilitação), por técnicas microbiológicas convencionais seguidas de confirmação por PCR, teste de resistência à cefoxitina dos isolados *S. aureus*, formação de biofilme (*S. aureus* isolados dos animais em reabilitação), pesquisa de genes enterotoxigênicos (*S. aureus* isolados de animais das propriedades) e comparação dos perfis moleculares (isolados *S. aureus* obtidos das propriedades e dos morcegos e *Y. enterocolitica* obtidas de morcegos) por reação em cadeia da polimerase de elementos repetitivos (rep-PCR). O percentual total de amostras das quais foram obtidos isolados foi 13,2% (93/703). *S. aureus* estava presente em 7,5% (12/160) dos animais domésticos e em 11,4% (62/543) dos animais silvestres. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi isolado de 3,7% (6/160) dos animais domésticos e de 8,8% (48/543) dos animais silvestres. Destacamos como portadores de MRSA as espécies *Sicalis flaveola*, *Turdus rufiventris*, *Furnarius rufus*, *Tadarida brasiliensis*, *Molossus molossus*, *Histiotus velatus* e uma grande diversidade de espécies animais no centro de reabilitação. Já *Y. enterocolitica* foi isolada de 2,4% (17/703) dos animais, *Salmonella* de 0,3% (2/703) e *Campylobacter* sp. de 0,3% (1/324). Dos *S. aureus* obtidos dos animais das propriedades, 35,3% (6/17) possuíam genes enterotoxigênicos. De 40 isolados obtidos de animais silvestres em reabilitação identificados como *S. aureus*, 72,5% foram capazes de formar biofilme. Foram encontrados isolados indistinguíveis e intimamente relacionados em animais domésticos e silvestres na mesma propriedade. Perfis moleculares indistinguíveis pela rep-PCR também indicaram o

compartilhamento de mesmas cepas, intra e interespecífico, de *S. aureus* entre os morcegos e entre os abrigos. Animais domésticos e silvestres atuam como carreadores de bactérias importantes em saúde única, destacando-se o papel destes enquanto reservatórios de MRSA, podendo inclusive eliminar esses microrganismos nas fezes, constituindo uma fonte potencial de contaminação para o meio ambiente, outros animais e até mesmo para o homem. Considerando-se a variedade de espécies que podem ser portadoras destas bactérias torna-se necessário que medidas higiênico-sanitárias, como manejo adequado dos animais e desinfecção periódica de ambientes, sejam adotadas, a fim de minimizar a possibilidade de transmissão desses microrganismos e de diminuir o risco de infecção.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. MRSA. *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella*. *Campylobacter*. Reservatórios.

Abstract

SILVEIRA, Débora Rodrigues. **Bacteria of one health concern isolated from domestic and wild animals: molecular similarity and antimicrobial resistance.**

Advisor: Cláudio Dias Timm. 2021. 115 f. Thesis (Doctor degree in Sciences) -

Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Data on wild animals carrying and spreading bacteria are scarce due to the difficulty of obtaining samples. Further studies are needed to determine the importance of bacteria carried by these animals in one health. In this study, the objective was to determine the occurrence of these bacteria in feces of wild birds, predominantly passerine, free-living and domestic animals of the same farm, wild animals in rehabilitation, for different causes, and bats that inhabit building as well as to analyze characteristics of the isolates. In the first study, samples of free-living wild birds' feces and up to five specimens of each domestic species were collected on a pluriactive farm. In the second, samples of animals received at a wildlife rehabilitation center were collected. In the third, bats were sampled, of species that inhabit buildings from different roost in the region of the Campus Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil. Investigation were carried out for *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *Salmonella* and *Campylobacter* (only for animals undergoing rehabilitation), by conventional microbiological techniques followed by PCR confirmation, resistance test to cefoxitin from *S. aureus* isolates, biofilm formation (*S. aureus* isolated from animals under rehabilitation), search for enterotoxigenic genes (*S. aureus* isolated from animal of the farms) and comparison of the molecular profiles (isolates *S. aureus* obtained from the farms and bats and *Y. enterocolitica* obtained from bats) by rep- PCR. The total percentage of samples from which isolates were obtained was 13.2% (93/703). *S. aureus* was present in 7.5% (12/160) of domestic animals and in 11.4% (62/543) of wild animals. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was isolated from 3.7% (6/160) of domestic animals and 8.8% (48/543) from wild animals. We highlight the species *Sicalis flaveola*, *Turdus rufiventris*, *Furnarius rufus*, *Tadarida brasiliensis*, *Molossus molossus*, *Histiotus velatus* and a great diversity of animal species in the rehabilitation center that hosted MRSA. *Y. enterocolitica* was isolated from 2.4% (17/703) of the animals, *Salmonella* from 0.3% (2/703) and *Campylobacter* from 0.3% (1/324). Of the *S. aureus* obtained from animals on the farms 35.3% (6/17) had some enterotoxigenic gene. Of 40 isolates obtained from wild animals in rehabilitation identified as *S. aureus*, 72.5% were able to form biofilm. Indistinguishable and closely related isolates were found in domestic and wild animals in the same property. Strains indistinguishable by rep-PCR also indicated that there is intra and interspecific transmission of *S. aureus* between bats and roosts. Domestic and wild animals host important bacteria in one health, highlighting their role as reservoirs of MRSA, and can even eliminate these microorganisms in the feces, constituting a potential source of contamination for the environment, other animals and even for the human. Considering the variety of

species, which may be carriers of these bacteria, it is necessary that hygienic-sanitary measures be adopted, such as adequate animal management and periodic disinfection of environments, be adopted in order to minimize the possibility of transmission of these microorganisms and decrease the risk of infection.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. MRSA. *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella*. *Campylobacter*. Reservoirs

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1 Percentage of domestic animals and wild birds in a pluriactive farm that hosted at least one of the pathogens surveyed in three collection phases.....	29
Figura 2 Rep-PCR electrophoresis gel of the <i>Staphylococcus aureus</i> isolates obtained from fecal samples of domestic and wild animals of a pluriactive farm.....	30

Artigo 3

Figura 1 Agarose gel (1.5%) after horizontal electrophoresis of products amplified in PCR of repetitive elements (rep-PCR) stained with Diamond.	64
---	----

Lista de Tabelas

Artigo 2

Tabela 1 Relation of animals that hosted <i>Staphylococcus aureus</i> , the sensitivity of the strain to cefoxitin (CFO), and biofilm formation capacity.....	43
---	----

Artigo 3

Tabela 1 Bats carrying bacteria that inhabit buildings in Capão do Leão-RS, Southern Brazil.....	63
--	----

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Objetivos.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3 Revisão da Literatura.....	17
3.1 Bactérias importantes em saúde única.....	17
3.2 Ambientes propícios à pesquisa de animais silvestres como potenciais reservatórios/transmissores de bactérias.....	20
3.3 Biofilme.....	19
3.4 Estudo de perfis moleculares.....	21
4 Artigos.....	22
4.1 Artigo 1.....	22
4.2 Artigo 2.....	39
4.3 Artigo 3.....	55
5 Considerações Finais.....	80
Referências.....	82
Anexos.....	93

1 Introdução

Desde o início do século XXI, observa-se uma crescente preocupação em relação a doenças emergentes e sua transmissão pelo contato entre animais silvestres e ambientes domésticos. Após inquérito da literatura, Greig *et al.* (2015) concluíram que existem lacunas no conhecimento relacionado à transmissão de patógenos alimentares por animais e à resistência a antimicrobianos pelos microrganismos isolados. A maior parte dos estudos relacionam transmissão de patógenos alimentares e resistência frente a antimicrobianos. Destacam-se *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp., albergados por aves, cervídeos, roedores, porcos selvagens e gambás, enquanto são poucos os estudos acerca da pesquisa de *Listeria* spp., *Aeromonas* spp. e *Staphylococcus aureus*. Os autores sugerem que são necessários mais estudos moleculares com isolados para entender o papel destes animais na manutenção e perpetuação dos patógenos e assim estabelecer métodos de controle e/ou erradicação eficientes.

Muitas espécies de animais silvestres servem como reservatório de bactérias patogênicas que ameaçam a saúde humana e dos animais domésticos. Por outro lado, as espécies de vida livre podem se contaminar com os animais domésticos e humanos e disseminar patógenos no meio ambiente, oferecendo risco à preservação da biodiversidade (Daszak *et al.*, 2000).

Dados sobre portadores de patógenos responsáveis por doenças bacterianas são escassos pela dificuldade de se obter amostras de animais silvestres, sendo necessários mais estudos por região para determinação da importância das bactérias em saúde pública, quando veiculadas por animais silvestres (Tompkins *et al.*, 2015). A compreensão sobre possíveis interações que promovam transmissão de patógenos entre animais silvestres, domésticos e seres humanos também deve ser entendida, só assim será possível definir estratégias de controle da transmissão dos microrganismos importantes em saúde única.

Hipótese

Staphylococcus aureus, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* e *Campylobacter* sp. com características relevantes em saúde única estão presentes em animais silvestres e ocorrem cepas comuns entre eles e os animais domésticos.

2 Objetivos

2.1 Geral

Verificar a ocorrência de patógenos importantes em saúde única em animais silvestres, estudar a interação com a ocorrência em animais domésticos e analisar características relevantes dos isolados.

2.2 Específicos

Identificar a ocorrência de *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *S. enterica* em fezes de aves silvestres de vida livre, animais domésticos e morcegos que habitam construções humanas

Identificar a ocorrência de *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *S. enterica* e *Campylobacter* sp. em fezes de animais silvestres em reabilitação.

Testar a resistência dos *S. aureus* isolados à meticilina.

Identificar a presença de genes codificadores de enterotoxinas em isolados da espécie *S. aureus*.

Identificar a capacidade de formação de biofilme *S. aureus* dos isolados dos animais que se encontram em reabilitação.

Verificar a ocorrência de mesmas cepas bacterianas em animais por comparação de perfis moleculares dos isolados.

3 Revisão da Literatura

3.1 Bactérias importantes em saúde única

A espécie *S. aureus* é frequentemente encontrado em vias aéreas de animais e humanos, sendo encontrado também no trato gastrointestinal (Castro-Silva *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2011). Este patógeno é considerado o mais importante em infecções humanas de pele e tecidos moles e também está associado a infecções nosocomiais com risco de vida, como pneumonia e septicemia (de Lencastre *et al.*, 2007). Possui sete tipos de toxinas que, quando ingeridas, podem causar intoxicação alimentar na qual os sintomas mais frequentes são náusea, vômito, cólicas abdominais, diarreia e sudorese. Além de *S. aureus*, também *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* têm sido associados a surtos de intoxicação de origem alimentar, sendo estas três espécies as de maior interesse em microbiologia de alimentos, embora também possam ser transmitidas diretamente a partir de portadores (Franco e Landgraf, 2003).

Em um estudo com animais silvestres de vida livre na Espanha, *S. aureus* estava presente em 5% da população estudada, sendo as espécies portadoras *Gyps fulvus* (abutre-fouveiro) (2/40), *Capra pyrenaica* (íbex-ibérico) (36/157), *Cervus elaphus* (cervo-vermelho) (54/273) e *Sus scrofa* (javalí) (126/473) (Porrero *et al.*, 2014). O gênero *Staphylococcus* também já foi isolado de mamíferos silvestres em um criadouro no Tocantins estudado por Gomes *et al.* (2011). A bactéria foi isolada de indivíduos da família Mustelidae e Tayassuidae.

O grupo *S. aureus* resistente à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) é um dos principais causadores de infecção nosocomial no homem, culminando com uma variedade de complicações que geram riscos à vida (Chambers, 2001). A principal linhagem isolada é predominantemente relacionada ao gado (Graveland *et al.*, 2011), outra de importância está relacionada a suínos e já foi isolada de bovinos e aves (Van Loo *et al.*, 2007). Portanto o homem, os animais de produção e o ambiente contaminado por eles podem constituir fontes de transmissão para animais silvestres e vice-versa. A evolução da resistência à meticilina por *S. aureus*

está associada à baixa afinidade por antibióticos β -lactâmicos, pela pressão da utilização de antibióticos ou possível resistência ambiental. Além destes, isolados resistentes à meticilina são resistentes a maior parte dos antimicrobianos comumente utilizados (Utsui e Yokota, 1985). Atualmente, cefoxitina passou a ser o antibiótico de escolha para os testes de sensibilidade à meticilina, já que a própria meticilina não é mais fabricada. Oxacilina permanece como segunda opção (Skov *et al.*, 2003; Felten *et al.*, 2002).

A espécie *Salmonella enterica* é considerada um patógeno amplamente distribuído no ambiente e pode ser encontrado em diversas espécies, como aves silvestres, roedores e artrópodes, que possibilitam a perpetuação do patógeno no ambiente e a transmissão para animais domésticos e para humanos (Hilbert *et al.*, 2012). Rubini *et al.* (2016), após analisarem 1.114 amostras intestinais obtidas de carcaças de animais silvestres provenientes de propriedades de criação de aves, suínos e bovinos na Itália, isolaram *S. enterica* de 2,87% dos animais amostrados, havendo maior prevalência em raposas e aves silvestres. Os autores afirmam que os animais selvagens onívoros estão particularmente expostos à contaminação e, consequentemente, à disseminação do microrganismo. *S. enterica* também foi isolada de amostras de fezes de mamíferos silvestres em cativeiro no Brasil (Gomes *et al.*, 2011) e de *Sicalis flaveola* de vida livre no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Dias *et al.*, 2019).

A espécie *Y. enterocolitica* é responsável por causar síndromes gastrintestinais, variando de enterite aguda a linfadenite mesentérica (Falcão *et al.*, 2006). Silveira *et al.* (2018), após coleta de fezes de animais silvestres alojados em um núcleo de recuperação da fauna silvestre, constataram que, de 73 animais amostrados, quatro (5,48%), *Vanellus chilensis* (quero-quero), *Turdus rufiventris* (sabiá-laranjeira), *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) e *Pantherophis guttatus* (cobra-do-milho), albergavam *Y. enterocolitica* e a estavam eliminando nas fezes, oferecendo risco de disseminação desse microrganismo no ambiente, além de constituírem-se em possíveis transmissores para humanos e outros animais (Kraushaar *et al.*, 2011).

O gênero *Campylobacter* é um importante patógeno envolvido em surtos de doenças de origem alimentar, transmitido principalmente por produtos avícolas, porém outras vias de infecções ainda devem ser estudadas (Germano e Germano, 2003; Centers for Disease Control and Prevention, 2011). Este microrganismo foi isolado de aves de vida livre da espécie *Chrysomus ruficapillus* (garibaldi) na região sul do Rio

Grande do Sul, demonstrando a ocorrência do patógeno em animais silvestres na região (Dias et al., 2014).

3.2 Ambientes propícios à pesquisa de animais silvestres como potenciais reservatórios/transmissores de bactérias

Nunes et al. (2010) ressaltam que animais silvestres oriundos de apreensão e/ou tráfico se tornam potenciais transmissores de zoonoses, caso alberguem patógenos, mesmo que se apresentem saudáveis. Neste contexto, torna-se relevante monitorá-los continuamente.

O Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), desde 1998, recebe e trata animais silvestres que são encontrados feridos, órfãos ou oriundos do tráfico ilegal e, atualmente, é a principal referência de apoio ao trabalho de fiscalização e apreensão de animais silvestres pelas Polícias Ambiental, Civil e Militar Estadual e Federal na região sul do Rio Grande do Sul (NURFS, 2008). A presença de animais contaminados em um centro de reabilitação representa uma ameaça tanto para outros animais como para humanos que entram em contato com eles ou com o ambiente contaminado.

A ocorrência de doenças infecciosas emergentes e sua relevância para a saúde humana aumentam o interesse em pesquisa com morcegos. Estes animais podem ser considerados potenciais reservatórios e vetores de transmissão de patógenos causadores de zoonoses. As atividades de pesquisa têm sido predominantemente focadas em agentes virais, enquanto a prevalência de bactérias patogênicas em morcegos tem sido largamente negligenciada. Patógenos entéricos encontrados em morcegos são muitas vezes considerados originários da dieta dos morcegos e habitats de forrageamento, sendo determinadas bactérias comumente encontradas compondo a microbiota normal destes animais, apesar do fato de que pouco se sabe sobre o tema ou mesmo sobre os ciclos de transmissão envolvendo morcegos, humanos e outros animais. Para alguns patógenos bacterianos comuns em doenças tanto em humanos quanto em animais, como *Yersinia* spp., *Pasteurella* spp., *S. enterica* e *E. coli*, o potencial de transmissão por morcegos deve ser mais estudado (Mühldorfer, 2013).

Com a destruição de habitats naturais pela expansão das áreas rural e urbana, muitas espécies de morcegos encontraram nas cidades um excelente local para conseguir abrigo e alimento nas construções humanas. *Tadarida brasiliensis*

(morceguinho-das-casas) é um exemplo de espécie comumente encontrada em ambientes urbanos (Pacheco *et al.*, 2010). A presença de morcegos albergando patógenos importantes em saúde pública em construções humanas pode constituir um problema para saúde pública, considerando o risco de transmissão direta ou indireta a partir de fezes contaminadas.

A pluriatividade consiste na utilização de mais de uma atividade agrícola, na maioria das vezes para aumento da renda. No Rio Grande do Sul, são comuns as pequenas propriedades de produção familiar, que como estratégia de manutenção e lucratividade, utilizam a criação de diversas espécies de animais no mesmo ambiente, para subsistência e/ou comercialização (Schneider *et al.*, 2006). Os animais domésticos criados nestas propriedades servem para o consumo, produzindo carne, leite e ovos, entre outros produtos, ou para companhia. Quando albergam microrganismos causadores de doença transmitida por alimento (DTA) podem contaminar o homem, pelo consumo desses produtos, contato direto ou contaminação do ambiente e da água (de Sá e Ferreira, 2007). Também podem contaminar animais silvestres, os quais podem servir como disseminadores dos microrganismos. Um fator importante a ser estudado é o estreito contato entre espécies de animais, podendo uma espécie contaminar outras e assim gerar a perpetuação de patógenos por se adaptarem a diferentes animais.

3.3 Biofilme

Biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (Donlan e Costerton, 2002). Existe uma alta prevalência de infecções relacionadas com biofilme, já que as bactérias, quando em biofilme, ficam menos acessíveis à ação de antibacterianos e podem alcançar número suficiente para representar uma potencial dose infectante (Davies, 2003). Conforme as características dos microrganismos, os biofilmes podem ser produzidos sobre uma variedade de substratos, como aço inoxidável, vidro e borracha, entre outros (Milan *et al.*, 2015; Parizzi *et al.*, 2004). A capacidade de formação de biofilme por determinados microrganismos pode contribuir para a dificuldade de desinfecção de instalações, equipamentos e gaiolas, propiciando a permanência de patógenos no

ambiente e aumentando o risco de contaminação de outros animais e seres humanos (Davies, 2003).

3.4 Estudo de perfis moleculares

O estudo dos perfis moleculares de *S. enterica*, *Y. enterocolitica* e *S. aureus* isolados de fezes obtidas de animais domésticos, silvestres e humanos constitui valioso instrumento para o avanço no conhecimento da epidemiologia das enfermidades causadas por estes microrganismos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) de elementos repetitivos (rep-PCR) pode ser gerada pela determinação da presença de sequências repetidas que estão distribuídas no genoma através da PCR de elementos palindrômicos repetitivos, de forma a compor um perfil molecular (Kudirkienė *et al.*, 2010). A identificação de cepas similares em distintas espécies hospedeiras é uma informação importante para a compreensão das formas de transmissão dos agentes etiológicos.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Pathogens of public health concern shared by domestic and wild animals in a pluriactive farm

Débora Rodrigues Silveira, Thamíris Pereira de Moraes, Kauana Kaefer, Rebeca Camargo Porto, Luiz Gustavo Bach, Juliane Leite Alves, Thaís Gonçalves Gonçalves e Cláudio Dias Timm

Publicado na revista Brazilian Journal of Development

**Patógenos importantes em saúde pública compartilhados por animais domésticos
e silvestres em propriedade pluriativa**

**Pathogens of public health concern shared by domestic and wild animals in a
pluriactive farm**

Débora Rodrigues Silveira
 Mestra em Nutrição e Alimentos
 Doutoranda pelo programa de Pós-Graduação em Veterinária
 Universidade Federal de Pelotas
 Avenida Eliseu Maciel s/nº, 354, Capão do Leão-RS, Brasil
debora.rsilveira@hotmail.com

Thamíris Pereira de Moraes
 Mestra em Ciências
 Doutoranda pelo programa de Pós-Graduação em Veterinária
 Universidade Federal de Pelotas
 Avenida Eliseu Maciel s/nº, 354, Capão do Leão-RS, Brasil
mirismoraes@hotmail.com

Kauana Kaefer
 Mestra em Ciências
 Residente em patologia Clínica veterinária
 Universidade federal do rio grande do sul
 Avenida Ipiranga, 7563, apto. 401, Porto-Alegre-RS, Brasil
kauanakaefer@gmail.com

Rebeca Camargo Porto
 Bacharel em Química de Alimentos
 Universidade Federal de Pelotas
 Avenida Eliseu Maciel s/nº 354, Capão do Leão-RS, Brasil
rebeca_porto@outlook.com

Luiz Gustavo Bach
 Graduando do curso de Medicina Veterinária
 Universidade Federal de Pelotas
 Avenida Eliseu Maciel s/nº 354, Capão do Leão-RS, Brasil
lugubach@hotmail.com

Juliane Leite Alves
 Graduanda do curso de Medicina Veterinária
 Universidade Federal de Pelotas
 Avenida Eliseu Maciel s/nº 354, Capão do Leão-RS, Brasil
julianemv31@gmail.com

Thaís Gonçalves Gonçalves
 Mestra em Ciências

Secretaria de Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Assuntos Agrários
Prefeitura de Sant'Ana do Livramento
Av. Dom Pedro II, 401, Faculdade, Sant'ana do Livramento-RS, Brasil
thaais.g@hotmail.com

Cláudio Dias Timm
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Professor titular da faculdade de Veterinária
Universidade Federal de Pelotas
Avenida Eliseu Maciel s/nº 354, Capão do Leão-RS, Brasil
timm@ufpel.edu.br

Resumo

Os objetivos deste estudo foram identificar a ocorrência de patógenos importantes em saúde pública em animais domésticos e silvestre em uma propriedade pluriativa, detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas em isolados da espécie *S. aureus* e verificar a presença da mesma cepa de patógeno entre animais. Foram coletadas amostras das fezes de até cinco exemplares de cada espécie doméstica e de animais silvestres. Isolados foram obtidos, foram realizadas a identificação / confirmação de espécies, detecção de genes enterotoxigênicos, comparação de perfis moleculares e foram identificados *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). O percentual total de amostras das quais foi obtido algum isolado foi 7,9% (19/241). *S. aureus* estava presente em 7,5 % (12/160) dos animais domésticos e em 6,2% (5/81) dos animais silvestres. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi isolado de 3,7% (6/160) dos animais domésticos e de 4,9% (4/81) dos animais silvestres. Já *Y. enterocolitica* foi isolada de 1,2% (1/81) dos animais silvestres e *Salmonella* de 0,6% (1/160) dos animais domésticos. 35,3% (6/17) dos isolados *S. aureus* possuíam algum gene enterotoxigênico. Foram encontrados isolados indistinguíveis e intimamente relacionados em animais domésticos e silvestres havendo comprovação da circulação de cepas entre animais ou indicando a presença fontes de contaminação comuns entre eles, o que confirma que há circulação de cepas entre animais ou pelo menos indica a presença de uma fonte comum de infecção entre eles.

Palavras-chave: aves, *S. aureus*, MRSA, *Salmonella*, *Yersinia*, disseminação de patógenos.

Abstract

The objectives of this study were to identify the occurrence of pathogens of public health concern in wild and domestic animals within a pluriactive farm, to detect the presence of genes coding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates and to identify the occurrence of the same strain in different animals. Fecal samples of up to five specimens of each domestic and wild species were collected. Isolates were obtained, were realized the species identification/confirmation, detection of enterotoxigenic genes, the comparison of molecular profiles and were identified the Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Total percentage of samples from which some isolate was obtained was 7.9% (19/241). *S aureus* was present in 7.5% (12/160) of domestic animals and in 6.2% (5/81) of wild animals. MRSA was isolated from 3.7% (6/160) of domestic and from 4.9% (4/81) of wild animals. *Yesrinia enterocolitica* was isolated from 1.2% (1/81) of wild animals and *Samonella* from 0.6% (1/160) of domestic animals. 35.3% (6/17) of *S. aureus* isolates had one of the enterotoxigenic genes. Indistinguishable and closely related isolates were found in domestic and wild animals, which confirms that there is a circulation of strains between animals or at least indicates the presence a common source of infection between them.

Keywords: birds, *S. aureus*, MRSA, *Salmonella*, *Yersinia*, pathogen dissemination.

1. INTRODUCTION

The pluriactivity of a farm consists of the use of more than one agricultural activity, mostly to increase the income in the farm. In the Rio Grande do Sul State, it is common that small familiar farms, as a management and profitability strategy, raise different species of domestic animals within the same territory for subsistence and/or trading (Schneider *et al.*, 2006). Domestic animals raised within these farms are raised mainly for subsistence consumption, providing meat, milk and eggs, among other products, or as pets. When they host any microorganism that cause foodborne diseases (FBD) they may infect man, through the consumption of their products, direct contact or contamination of the environment and water (de Sá and Ferreira, 2007). They may also infect wild animals, which can act as microorganism disseminators. An important factor to be studied is the close contact between animal species, with one transmitting to the other, thus perpetuating the pathogens through their adaptation to different animals.

Bacteria of public health concern, such as *S. aureus* (Gomes *et al.*, 2011), *Y. enterocolitica* (Silveira *et al.*, 2018) and *Salmonella* (Dias *et al.*, 2019) have already been isolated from wild and domestic animals in Brazil (Dias *et al.*, 2019). *S. aureus* can infect humans (Bastos *et al.*, 2020), and/or can produce several toxins that, once ingested, may cause food poisoning, though the microorganism can be transmitted directly from a carrier (Franco and Landgraf, 2003).

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major agents of nosocomial infections that can culminate in a variety of complications that are life-threatening (Chambers, 2001). The main strain isolated from domestic animals is predominantly related to cattle (Graveland *et al.*, 2011). Another important strain is related to pigs and has also been isolated from cattle, poultry (Van Loo *et al.*, 2007) and free-living wild animals (Porrero *et al.*, 2013).

The study on the molecular profiles of *Salmonella*, *Y. enterocolitica* and *S. aureus* isolated from feces of domestic and wild animals represents a valuable instrument in the advance of epidemiologic knowledge of the diseases caused by these microorganisms. The identification of similar strains of these pathogens in distinct species is an important information to understand the forms of transmission of etiological agents. The polymerase chain reaction (PCR) of repetitive elements (rep-PCR) can be generated by the determination of the presence of repeated sequences in the genome through PCR of repetitive palindromic elements, that composes a molecular profile (Kudirkienė *et al.*, 2010).

Data on pathogen carriers responsible for bacterial diseases are scarce, since it is difficult to obtain samples from wild animals. Hence, more surveys along regions are necessary, in order to determine the relevance of the bacteria transmission by wild animals to public health (Tompkins *et al.*, 2015). The understanding on the possible interactions that promote pathogen transmission between wild and domestic animals must also be better understood. Thus, it will be possible to define strategies to control the transmission of microorganisms of public health concern.

The objectives of this study were to identify the occurrence of *S. aureus*, MRSA, *Y. enterocolitica* and *Salmonella* in fecal samples of wild and domestic animals within a pluriactive farm, to detect the presence of genes coding enterotoxins in *S. aureus* isolates and to identify the occurrence of the same strain in different animals.

2. MATERIAL AND METHODS

Sample collection

One farm that had more than five different species of domestic animals was selected for the study. Three collection phases during spring in three consecutive years were performed, which corresponded to four successive visitations during the collection periods. Fecal samples of at least five specimens of domestic animals, randomly selected, were collected. The feces of wild animals were also collected. The species of wild animals collected varied according to the animals that were captured.

Wild birds were captured with two mist nets, of 12 meters each, positioned in strategic locations within the farm. In each visit the capture effort was of 8h, four in the end of the afternoon and the other four in the morning of the following day. After the collection of fecal samples, birds were taxonomically identified (genus and species), according to the Annotated Checklist of the Birds of Brazil by The Brazilian Ornithological Records Committee (*Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos*, Piacentini *et al.*, 2015), and were discretely marked on the back with inodorous and non-toxic ink (All-Wheather, USA), in order to be identified in case of recapturing, avoiding sample duplication, and immediately released.

Fecal samples were directly obtained from the anus or the cloaca, according to the situation, with the aid of sterile swabs and dispatched to the laboratory in transport media Cary Blair (Himedia, Mumbai, India), in an isothermal container with ice.

Isolates acquisition

The determination of *S. aureus* presence was carried out by directly spreading of swabs with fecal samples on Baird-Parker agar surface (Himedia, Mumbai, India) and then incubating the plate at 37°C for 48 h. Three typical and three atypical colonies of *S. aureus* were inoculated on a Brain and Heart Infusion broth (BHI, Himedia) and incubated at 37°C for 24 h to perform the coagulase test. In this test, 0.3 mL of culture were inoculated in 0.3 mL of blood plasma and for 6 h of incubation at 37°C the formation of clots was monitored. The coagulase-positive isolates were submitted to PCR test to identify *S. aureus*.

The detection of *Y. enterocolotica* was carried out by streaking of the samples on MacConkey agar (MC, Himedia). After incubation at 37°C for 48 h, three lactose-negative colonies were seeded in BHI broth and, after incubation at 37°C for 24 h, motility tests were performed according to Weagant and Feng (2017). Isolates with the motility compatible with *Y. enterocolitica* were then identified through PCR test.

To assess *Salmonella*, swabs were placed into 10 mL of Buffered Peptone Water (BPW, Himedia) for pre-enrichment and remaining procedures, as recommended by US Food and Drug Administration – FDA (Andrews *et al.*, 2020). Species identification was performed through PCR test.

Isolate cultures in BHI broth were mixed to 20% of glycerol to stock at -18°C. When necessary, isolates were recovered in BHI at 37°C for 24 h.

Molecular identification

DNA of the isolates was extracted according to Sambrook and Russel (2001). For complete cell lysis of coagulase-positive *Staphylococcus*, 100 µL of Lysostaphin solution (100 µg/mL of Lysostaphin in 20 mM of acetate buffer) was added after obtaining a pellet by centrifugation of the culture in BHI, and incubated at 37°C for 1 h.

The identification of *S. aureus* was carried out through PCR test using primers *au-F3* and *au-nucR*, according to a protocol previously reported by Sasaki *et al.* (2010) with modifications: the primers for the identification of *S. intermedius* and *S. hucus* were not used, and the volume of the solution was completed with water. The identification of *Y. enterocolitica* was performed through PCR test, according to Wannet *et al.* (2001), with modifications, since gene *ail* was not assessed, and primers were substituted by water. The PCR test for *Salmonella* identification was performed according to Oliveira *et al.* (2003). PCR products were stained with Blue Green (LGC Biotecnologia, Cotia, Brazil), and visualized in a 1.0% agarose gel.

Presence of genes coding toxins in *S. aureus* isolates

The identification of genes that coded staphylococcal toxins A (*sea*) and C (*sec*) in the *S. aureus* isolates was carried out through PCR test, as reported by Cunha *et al.* (2007), with

modifications: the primers for amplification of genes *seb*, *sed* and *tst* were not used, and the volume of reaction was completed with water. For the identification of genes that coded enterotoxins B (*seb*) and D (*sed*) the PCR test was carried out as reported by Andretta (2019). PCR products, stained with Blue Green, were visualized in a 2.0% agarose gel.

Comparison of molecular profiles of the isolates

The molecular profile of the isolates of each species was assessed through the rep-PCR technique, by using primer (GTG)₅ (Versalovic *et al.*, 1994). The products of rep-PCR were submitted to a 2% agarose gel electrophoresis and stained with Blue Green for the visualization of band patterns of the different amplified regions. Band profiles obtained were analyzed comparatively according to Tenover *et al.* (1995).

Identification of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Strains previously confirmed as *S. aureus* were submitted to disk-diffusion test in Müller-Hinton agar, using a 30 µg of cefoxitin disk (Skov *et al.*, 2003) for the identification of MRSA. The results obtained were assessed according to the Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), which considers a microorganism as resistant when the inhibition halo has a diameter lower than 21 mm and sensitive when halos have a diameter equal to or higher than 22 mm.

This study was authorized by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Universidade Federal de Pelotas, code CEEA n. 0978-2016. The capture of wild animals was authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio), n. 52646-1.

3. RESULTS AND DISCUSSION

One hundred and sixty domestic animals and 77 wild birds were sampled. One of the wild birds, *Cairina moschata* (Muscovy duck) had a nest within the area of the farm's headquarters. Moreover, fecal samples from one *Rattus rattus* (Black rat) and three *Sus scrofa* (Wild boars), captured by the farm's owner during the execution of the survey, were collected, making a total of 241 fecal samples. The total percentage from which at least one isolate was obtained was 7.9% (19/241), with 0% (0/79) in the first collection phase, 25.4% (15/59) in the second, and 3.9% (4/103) in the third collection phase (Figure 1).

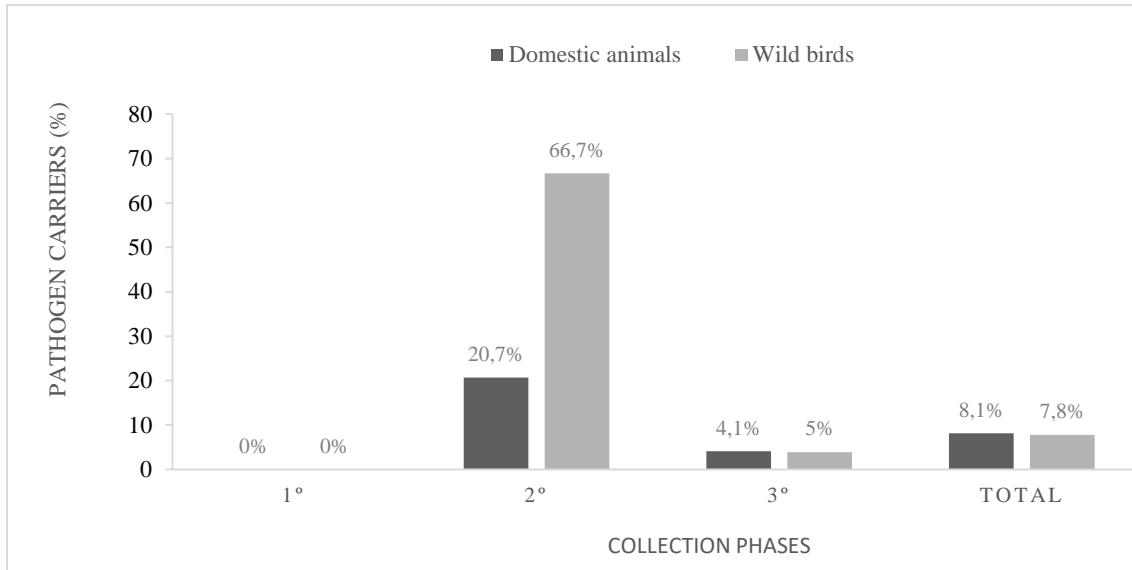


Figure 1. Percentage of domestic animals and wild birds in a pluriactive farm that hosted at least one of the pathogens surveyed in three collection phases.

In the first phase, 58 fecal samples of domestic animals and 20 fecal samples of wild birds of nine species were collected, including samples of *Cairina moschata* and *Rattus rattus*. The microorganisms surveyed were not isolated from any of the samples.

In the second phase, 53 fecal samples of domestic animals of 11 different species and six fecal samples of wild birds of four species were collected. Eleven out of 53 (20.8%) of the domestic animals' samples were contaminated by *S. aureus*, which were obtained from pigs (2/3), cats (2/3), chickens (2/2), dogs (2/2), turkeys (2/2), and sheep (1/1). *S. aureus* was also isolated from 66.7% (4/6) of the wild animals' samples, which were the birds of the species *Sicalis flaveola* (1/2), *Turdus rufiventris* (1/1), *Furnarius rufus* (1/1) and *Passer domesticus* (1/1). Of the *S. aureus* identified, 53.3% (8/15) were resistant to cefoxitin and therefore classified as MRSA, in which 33.3% (5/15) were obtained from feces of domestic animals, chickens (2/2), pigs (1/3), dogs (1/2), turkeys (1/2), and 20.0% (3/15) from the wild birds *S. flaveola* (1/2), *T. rufiventris* (1/1) and *F. rufus* (1/1). *Y. enterocolitica* and *Salmonella* spp. were not isolated from any of the samples.

In the third phase, feces from 49 domestic animals of 12 different species were collected and 51 wild birds of six species were captured and sampled, in addition to samples of three *Sus scrofa*. Two (1.9%) animals were infected by *S. aureus*, one bull (1/5) and one wild bird of *S. flaveola* species (1/17). Both (100%) were classified as MRSA. One (0.1%) of the 103 animals surveyed hosted *Y. enterocolitica*, one passerine of *S. flaveola* (1/17) species. *Salmonella* was isolated in one (1%) out of the 103 samples, from the feces of a cat (1/4).

When the molecular profiles of the *S. aureus* isolates obtained from domestic and wild animals were compared, some of them were considered indistinguishable or closely related (Figure 2). One of them was common to a chicken, a dog, a cat, a pig, and a bull (profile A), comprising two phases of sample collections, and the other was common to a sheep and a *F. rufus* (profile F).

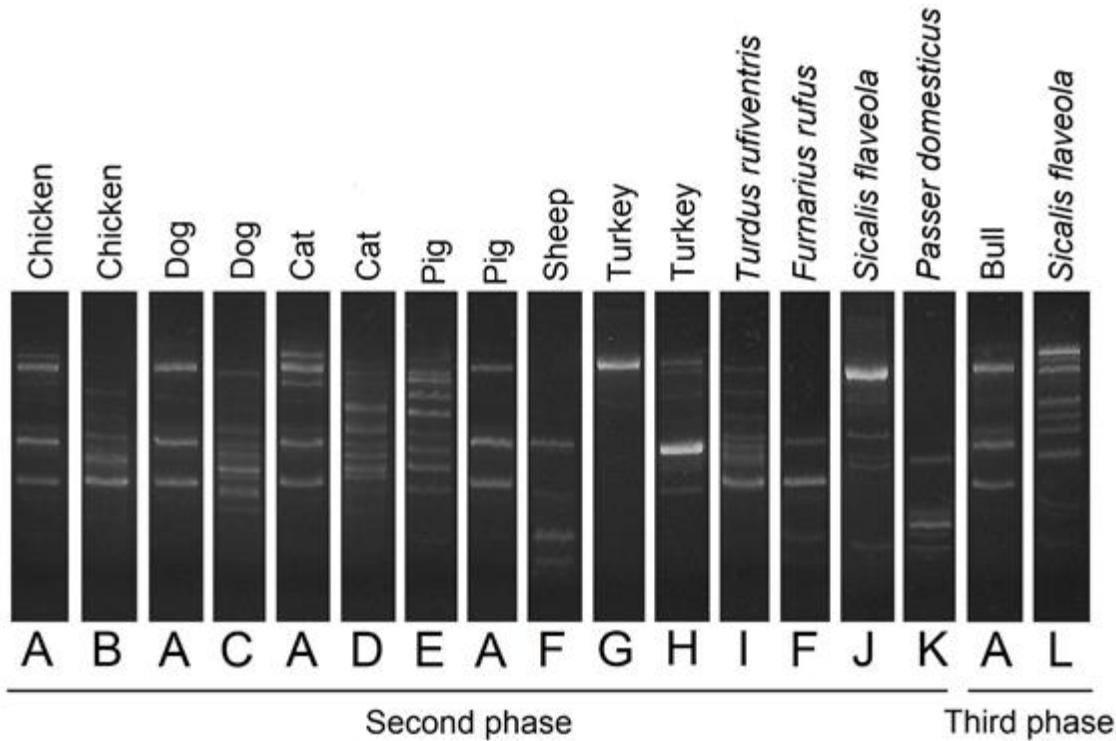


Figure 2. rep-PCR electrophoresis gel of the *Staphylococcus aureus* isolates obtained from fecal samples of domestic and wild animals of a pluriactive farm. Profiles are grouped by letters according to the similarity.

As for the presence of genes coding enterotoxins, four (23.5%) out of the 17 isolates of *S. aureus* had the *sec* gene, which were obtained from cats (2/5), dogs (1/5) and chicken (1/5), and two (11.8%) had the *sed* gene, obtained from a dog (1/5) and a bird of *T. rufiventris* species (1/1), all of them during the second phase. *Sea* and *seb* genes were not present in any of the isolates.

The percentage of isolates obtained from domestic and wild animals did not differ greatly (Figure 1), except for the 66.7% of the isolates from feces of wild birds found in the second phase, which could be the consequence of the small number of wild birds captured in this phase. This is an important epidemiological association that suggests that the sources of contamination for both domestic and wild animals were equally influenced by factors that favored bacterial replication, possibly climatic or the management within the farm. On the other

hand, there was a significant variation of the percentage of isolation between collection phases, which demonstrates that the level of infection in the animals varies from year to year, possibly due to climatic and management variations within the farm as well.

One of the reasons that could explain the high occurrence of pathogens in wild birds and the small number of captured birds in the second phase, is that passerines seem to serve as a reservoir and those that were not already infected are more susceptible. Therefore, outbreaks related to enterobacteria may occur when the birds are in a poor condition, as described by Söderlund *et al.* (2019) in a study that reported the transmission of *Salmonella* by passerines.

This study demonstrated that pigs, cattle, sheep, birds, dogs, and cats raised in pluriactive farms, as well as wild birds of the species *S. flaveola*, *T. rufiventris*, *F. rufus* and *P. domesticus* could serve as reservoirs of *S. aureus*, being able to disseminate the pathogen through their feces in the environment. These species of both domestic and wild animals, when hosting *S. aureus*, constitute potential transmitters of pathogens to both humans and other animals, by direct contact through the consumption of animal products or by environmental and water contamination (de Sá and Ferreira, 2007). On the other hand, wild birds could be infected through domestic animals and humans (Daszak *et al.*, 2000). The fact that free-living birds *S. flaveola*, *T. rufiventris* and *F. rufus* carried MRSA presupposes that their infection occurred directly or indirectly from domestic animals or humans, from which these strains were originated.

Isolates that were common among domestic animals (profile A) and among domestic and wild animals (profile F) were found, indicating a transmission interaction of strains between domestic and wild animals or a common source of infection. This variation among highly different carriers is possible by the fact that some strains of *S. aureus* have few specificity restrictions regarding the host and are able to colonize several species (Graveland *et al.*, 2011) and continue their perpetuation. The occurrence of a common molecular profile (profile A), found both in the first and the second phases, indicates the permanence and circulation of a pathogen strain for a long period among domestic animals within the farm.

The presence of MRSA strains weakly species-specific in rural areas increase the concern regarding the dissemination among animals and the potential infection of humans. It has already been demonstrated that people that hosted MRSA when in direct contact with both production or companion animals, exhibited an increased risk of carrying the same strains of MSRA as animals (Morgan, 2008). Once MRSA infect humans, there is great difficulty in the treatment of patients due to the broad resistance of this microorganism to antibiotics.

The presence of the *sec* gene in 23.5% (4/17) and the *sed* gene in 11.8% (2/17) of *S. aureus* isolates indicates the potential pathogenicity of strains present in pets, production and wild animals within the farm. In a study conducted by Smyth *et al.* (2005), the *sec* gene was present in 51 out of 191 *S. aureus* isolates obtained from cattle (19/99), goats (18/39) and sheep (14/23), and one isolate obtained from a cat had the *sed* and *sej* genes. The presence of two cats, one dog and one chicken hosting *S. aureus* with the *sec* gene and one dog hosting *S. aureus* that had the *sed* gene suggests risks to human and animal health. Furthermore, the fact that one *T. rufiventris* hosted *S. aureus* with the *sed* gene represents a potential risk for the perpetuation of the pathogen in the farm and a greater potential for the dissemination of this strain, since it was found in a free-living bird.

S. flaveola may carry *Y. enterocolitica* and, consequently, be a potential disseminator of these pathogens to the environment, domestic animals, men and food. *Y. enterocolitica* seem to exhibit lower transmissibility than *S. aureus* (Silveira *et al.*, 2018). Possibly because of that, a lower occurrence of *Y. enterocolitica* was observed in our study.

The cat that hosted *Salmonella* could have been infected from passerines throughout the years. It has already been demonstrated that mass seasonal migration of passerines seems to cause outbreaks of *Salmonella* Typhimurium among cats in certain years in Sweden, probably due to predation of weakened birds. From this transmission, outbreaks can occur among humans, caused by contact with infected domestic cats or through environmental contamination (Söderlund *et al.*, 2019). Others carriers of *Salmonella* were not found within the farm, neither in domestic nor in wild animals, that could be the source of contamination. On the other hand, pets can be infected through humans which are possible sources of infection.

4. CONCLUSIONS

Domestic and wild animals in a pluriactive farm can be pathogens of public health concern carriers and share the same strains, which can remain circulating among the animals of the farm for at least one year.

S. aureus, including MRSA, can be present in the feces of both domestic (pigs, cats, chickens, turkeys, sheep, and cattle) and wild animals (*S. flaveola*, *T. rufiventris*, *F. rufus* and *P. domesticus*) within the same pluriactive farm. Cats, dogs, chickens and *T. rufiventris* can carry potentially enterotoxigenic *S. aureus*. *S. flaveola* can be a reservoir of *Y. enterocolitica*, as well as cats can carry *Salmonella*. Considering the variety of species, both domestic and wild, that can carry bacteria of public health concern and the long time that these pathogens remain in the farm, it becomes necessary that hygienic-sanitary care measures are adopted, in

order to minimize the possibility of transmission of these microorganisms and decrease the risk of infection for humans, domestic and wild animals and as well as environmental contamination.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly financed by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Financial Code 001.

REFERENCES

ANDRETTA, M. Serro artisanal cheese produced in Brazil has a microbial safety status for consumers. 2019. 47p. Dissertation (masters) - Universidade Federal de Viçosa.

ANDREWS, W.H.; ANDREW, J.; HUA, W.; JACOBSON, A.; GE, B.; ZHANG, G.; HAMMACK, T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 5. 2020. Available at: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>> Accessed on: Nov 24 2020.

BASTOS, E.C.B.; COSTA, A.N.B.; DE SOUSA, P.D.L.; MOREIRA, N.S.; DE SOUSA, M.V.A.; ARAGÃO, B.P.; PAIVA, T.V.; DO NASCIMENTO, M.D.A. Prevalência de microrganismos isolados de hemoculturas em uma UTI adulto de um hospital de ensino no interior do Ceará. **Brazilian Journal of Development**, v.6, p.59043-59047, 2020.

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p.178, 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.

CUNHA, M.R.L.S.; CALSOLARI, R.A.O.; JÚNIOR, J.P.A. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.381-390, 2007.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. **Science**, v.287, p.443-449, 2000.

DIAS, P.A.; MORAES, T.P.; WILSMANN, D.E.; FERRASSO, M.M.; MARINHEIRO, M.F.; HEINEN, J.G.; CALABUIG, C.I.P.; TIMM, C.D. *Campylobacter* and Enterobacteriaceae in wild birds and poultry. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, p.225-231, 2019.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 269 pp.

GOMES, C.M.B.; BATISTA, K.S.; OLIVEIRA, A.S.; BEZERRA, L.M. Determinação de enterobactérias de mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.11, p.74-80. 2011.

GRAVELAND, H.; DUIM, B.; VAN DUIJKEREN, E.; HEEDERIK, D.; WAGENAAR, J.A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **International Journal of Medical Microbiology**, v.301, p.630-634, 2011.

KUDIRKIENĖ, E.; MALAKAUSKAS, M.; MALAKAUSKAS, A.; BOJESEN, A.M.; OLSEN, J.E. Demonstration of persistent strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.868-877, 2010.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1181–1187, 2008.

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; CÉ, M.C.; ROCHA, S.L.S.; CANAL, C.W. Evaluation of selective and nonselective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.217-221, 2003.

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, p.291-298, 2015.

PORRERO, M.C.; MENTABERRE, G.; SÁNCHEZ, S.; FERNÁNDEZ-LARIO, P.; GÓMEZ-BARRERO, S.; NAVARRO-GONZALEZ, N.; SERRANO, E.; CASAS-DÍAZ, E.; MARCO, I.; FERNÁNDEZ-GARAYZABAL, J.F.; MATEOS, A.; VIDAL, D.; LAVÍN, S.; DOMÍNGUEZ, L. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. **Veterinary Journal**, v.198, p.127-130, 2013.

DE SÁ, M.I.; FERREIRA, C. **Importância das zoonoses na segurança alimentar**. 2007. Available at: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-14-17.pdf>> Accessed on: Oct 07 2020.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100p.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.765-769, 2010.

SCHNEIDER, S.; CONTERATO, M.A.; KOPPE, L.R.; SILVA, C.D. A pluriatividade e as condições de vida dos agricultores familiares do Rio Grande do Sul. In: SCHNEIDER S. (2 ed.) **A diversidade da agricultura familiar**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. p.137-164.

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. e *Yersinia enterocolitica* isoladas de animais silvestres em um centro de reabilitação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, p.1838-1843, 2018.

SKOV, R.; SMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A.R.; FRIMODT-MOLLER, N.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on

Iso-Sensitest agar for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.204-207, 2003.

SMYTH, D.S.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; FITZGERALD, J.R.; DEOBALD, C.F.; BOHACH, G.A.; SMYTH, C.J. Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.401-411. 2005.

SÖDERLUND, R.; JERNBERG, C.; TRÖNNBERG, L.; PÄÄJÄRVI, A.; ÅGREN, E.; LAHTI, E. Linked seasonal outbreaks of *Salmonella* Typhimurium among passerine birds, domestic cats and humans, Sweden, 2009 to 2016. **Eurosurveillance**, v.24, p.1-10, 2019.

TENOVER, F.C.; AABEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233–2239, 1995.

TOMPKINS, D.M.; CARVER, S.; JONES, M.E.; KRKOŠEK, M.; SKERRATT, L.F. Emerging infectious diseases of wildlife: a critical perspective. **Trends in Parasitology**, v.31, p.149-159, 2015.

VAN LOO, I.; HUIJSDENS, X.; TIEMERSMA, E.; DE NEELING, A.; VAN DE SENDE-BRUINSMA, N.; BEAUJEAN, D.; KLUYTMANS, J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1834-1839, 2007.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v.5, p.25-40, 1994.

WANNET, J.B.W.; REESSINK, M.; BRUNINGS, H.A. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive Duplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p4483-4486, 2001.

WEAGANT, S.D.; FENG, P. *Yersinia enterocolitica*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 8. 2017. Available at: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-8-yersinia-enterocolitica>> Accessed on: Oct 07 2020.

4.2 Artigo 2

MRSA and enterobacteria of one health concern in wild animals undergoing rehabilitation

Débora Rodrigus Silveira, Thamíris Pereira de Moraes, Kauana Kaefer, Luiz Gustavo Bach, Amanda de Oliveira Barbosa, Valéria Defavari Moretti, Paulo Quadros de Menezes, Uila Silveira de Medeiros, Thassiane Targino da Silva, Paulo Mota Bandarra, Luiz Fernando Minello, Cláudio Dias Timm
Publicado na revista Research, Society and Development

MRSA and enterobacteria of one health concern in wild animals undergoing rehabilitation

MRSA e enterobactérias importantes para saúde única em animais silvestres em reabilitação

MRSA y enterobacterias importantes para la salud única en animales salvajes en rehabilitación

Received: 01/09/2021 | Reviewed: 01/11/2021 | Accept: 01/00/2021 | Published: 01/17/2021

Débora Rodrigues Silveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7245-279X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: debora.rsilveira@hotmail.com

Thamíris Pereira de Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1513-930X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: <https://orcid.org/0000-0002-1513-930X>

Kauana Kaefer

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1968-3684>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: kauanakaefer@gmail.com

Luiz Gustavo Bach

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0913-8538>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: lugubach@hotmail.com

Amanda de Oliveira Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2888-7822>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: barbosa.oamanda@gmail.com

Valéria Defavari Moretti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6160-3505>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: vamoretti93@gmail.com

Paulo Quadros de Menezes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9898-9851>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: pauloquadros.vet@gmail.com

Uila Silveira de Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6588-0200>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: uilamedeiros@gmail.com

Thassiane Targino da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9626-311X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: thassiane.vet@gmail.com

Paulo Mota Bandarra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5441-205X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: bandarra.ufpel@gmail.com

Luiz Fernando Minello

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8777-1355>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: minellolf@hotmail.com

Cláudio Dias Timm

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3920-9066>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: timm@ufpel.edu.br

Abstract

The presence of contaminated animals in wildlife rehabilitation centers poses a threat for both animals and humans that come into contact with them or the contaminated environment. The aim of this study was to assess the presence of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), as well as studying the biofilm formation capacity of these isolates, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* and *Campylobacter* spp. in wild animals from a rehabilitation center. During a two-year period, feces were collected from animals that were admitted to a wildlife rehabilitation center (n=324 samples). The pathogens were isolated from 51 (15.7%) animals of different species of mammals, birds and reptiles. Forty isolates (12.3%) were identified as *S. aureus*, of these, 32 (9.9%) were identified as MRSA and 72.5% were able to form biofilm. *Y. enterocolitica* was found in five mammals (5.1%), three reptiles (21.43%) and two birds (0.94%). *Salmonella* and *Campylobacter* were isolated from one bird each (0.67% and 0.67%, respectively). A wide diversity of animal species in rehabilitation centers, including birds, mammals and reptiles, can carry MRSA and enterobacteria of one health concern and eliminate in the feces. The presence of these pathogens in the gastrointestinal tract of wild animals admitted to a wildlife rehabilitation center shows the importance of microbiological monitoring of animals at the time of their admission and reinforces the need for specific hygienic-sanitary care.

Keywords: Biofilm; Birds; *Campylobacter*; Mammals; Reptiles; *Salmonella*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*.

Resumo

A presença de animais contaminados em centros de reabilitação de animais silvestres representa uma ameaça para os animais e humanos que entram em contato com eles ou com o ambiente contaminado. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *Staphylococcus aureus*, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), bem como estudar a capacidade de formação de biofilme destes isolados, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. em animais silvestres recebidos em um centro de reabilitação. Durante o período de dois anos, foram coletadas fezes de animais recebidos em centro de reabilitação de fauna silvestre (n = 324 amostras). Os patógenos foram isolados de 51 (15,7%) animais de diferentes espécies de mamíferos, aves e répteis. Quarenta isolados (12,3%) foram identificados como *S. aureus*, destes, 32 (9,9%) foram identificados como MRSA e 72,5% foram capazes de formar biofilme. *Y. enterocolitica* foi encontrada em cinco mamíferos (5,1%), três répteis (21,43%) e duas aves (0,94%). *Salmonella* e *Campylobacter* foram isoladas de uma ave cada (0,67% e 0,67%, respectivamente). Uma grande diversidade de espécies animais em centros de reabilitação, incluindo aves, mamíferos e répteis, podem carrear MRSA e enterobactérias tornando-se um problema de saúde por eliminá-las nas fezes. A presença desses patógenos no trato gastrointestinal de animais silvestres internados em centro de reabilitação de fauna silvestre demonstra a importância do monitoramento microbiológico dos animais no momento de sua internação e reforça a necessidade de cuidados higiênico-sanitários específicos.

Palavras-chave: Biofilme; Aves; *Campylobacter*; Mamíferos; Répteis; *Salmonella*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*.

Resumen

La presencia de animales contaminados en los centros de rehabilitación de animales salvajes representa una amenaza para los animales y los seres humanos que entran en contacto con ellos o con el medio ambiente contaminado. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de *Staphylococcus aureus*, incluyendo *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), así como estudiar la capacidad de formación de biopelículas de estos, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* y *Campylobacter* spp. en animales salvajes recibidos en un centro de rehabilitación. Durante el período de dos años, se colectaron heces de animales recibidos en un centro de rehabilitación de vida silvestre (n = 324 muestras). Se aislaron patógenos de 51 (15,7%) animales de diferentes especies de mamíferos, aves y reptiles. Cuarenta aislamientos (12,3%) fueron identificados como *S. aureus*, de estos, 32 (9,9%) fueron identificados como MRSA y el 72,5% pudieron formar biopelículas. *Y. enterocolitica* se encontró en cinco mamíferos (5,1%), tres reptiles (21,43%) y dos aves (0,94%). Se aislaron *Salmonella* y *Campylobacter* de un ave cada (0,67% y 0,67%, respectivamente). Una gran diversidad de especies animales en centros de rehabilitación, incluyendo aves, mamíferos y reptiles, pueden ser portadores de MRSA y enterobacterias, convirtiéndose en un problema de salud al eliminarlas en las heces. La presencia de estos patógenos en el tracto gastrointestinal de los animales salvajes ingresados en un centro de rehabilitación de vida silvestre demuestra la importancia del monitoreo microbiológico de los animales al momento de su ingreso y refuerza la necesidad de cuidados higiénico-sanitarios específicos.

Palabras clave: Biopelícula; Aves; *Campylobacter*; Mamíferos; Reptiles; *Salmonella*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*.

1. Introduction

The abundance of animals admitted to wildlife rehabilitation centers offers a unique opportunity for research activities addressing pathogenic microorganisms (Yabsley, 2019). The presence of animals carrying pathogenic microorganisms in a wildlife rehabilitation center represents a threat for both animals and humans that come into contact with them or the contaminated environment. However, little has been studied about the species of wild animals capable of acting as pathogen carriers responsible for bacterial diseases (Tompkins et al., 2015), which makes difficult the adoption of preventive measures in the facilities that admit these animals.

Staphylococcus aureus, especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), which is one of the main agents of nosocomial life-threatening infections, due to its difficult treatment (Silva et al., 2020), *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* and *Campylobacter* spp. are pathogens of great one health concern and have already been isolated from the gastrointestinal tract of wild animals (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2017; Chambers, 2001; Porrero et al., 2013; Silveira et al., 2018; Gomes et al., 2011; Dias, 2015). These reports, however, address a very limited number of species that can be carriers of these microorganisms within a vast universe of species that must be studied.

Information concerning the species of animals that are associated with the transmission of pathogens, as well as the frequency of carriers, is necessary for the adoption of effective measures to control the spread of these microorganisms in wildlife rehabilitation centers. The understanding of specific characteristics of the bacteria carried by animals is also important for design of hygienic-sanitary protocols that should be adopted.

Biofilm is a community of sessile microorganisms characterized by cells that adhere to a surface, embedded in an extracellular matrix formed by exopolysaccharides. The ability to form biofilm is a trait that directly affects the elimination of the microorganisms from different surfaces (Donlan and Costerton, 2002). The presence of pathogens capable of forming biofilm in wildlife rehabilitation centers can make their elimination from facilities, equipment and utensils more difficult.

The objective of this study was to identify the occurrence of *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *Salmonella* and *Campylobacter* in the gastrointestinal tract of wild animals undergoing rehabilitation and to test the methicillin-resistance and the biofilm formation capacity of the isolated *S. aureus*.

2. Methodology

Sample collection

During two-year the Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre e Centro de Triagem de Animais Silvestres – Universidade Federal de Pelotas (NURFS/CETAS-UFPel) was monitored weekly. A qualitative (Pereira et al., 2018) census-type study was conducted considering the animals received and lodge in the nucleus the population, with the exception of those submitted to the liberation soon after clinical evaluation and those that died until the collection date, always performed on Mondays. The collection of feces from wild animals was carried out directly from the rectum or cloaca, using sterile swabs moistened in 0.85% saline solution. The swabs were placed in Cary Blair transport medium (Himedia, Mumbai, India) and immediately sent to the laboratory in isothermal boxes with ice.

The animals were taxonomically identified according to the Annotated Checklist of Brazilian Mammals (Paglia et al., 2012), the Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee (Piacentini et al., 2015) and Brazilian Reptiles: List of Species (Costa and Bérnilds, 2015).

Isolates obtention

The determination of the presence of coagulase-positive *Staphylococcus* was performed according to Timm et al. (2016), with modifications. Swabs with fecal samples were directly spread on Baird-Parker agar surface (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 37 °C for 48 h.

To assess *Y. enterocolitica*, streaking was performed on MacConkey agar (MC, Himedia). After incubation at 37 °C for 48h, three lactose negative colonies were spread on BHI and incubated at 37 °C for 24h. Afterwards, motility tests were performed (Weagant and Feng 2017).

To detect *Salmonella* spp., swabs were placed in 10 mL of Buffered Peptone Water (APT, Acumedia) for pre-enrichment and other procedures, as recommended by the U.S. Food and Drug Administration - FDA (Andrews et al., 2014). BHI cultures of the isolates were mixed with 20% glycerol to maintain stock at -18 °C. When necessary, the isolates were recovered in BHI at 37 °C for 24 h.

For the isolation of *Campylobacter* spp., swabs with fecal samples were directly spread on the surface of Columbia Blood Agar Base (Acumedia, Lansing, United States), enriched with 0.4% (m/v) of activated carbon, 5% (m/v) of FBP oxygen reducing solution, 1% (m/v) of Campylobacter I supplement (Himedia, Mumbai, India) and a mixture of antibiotics. The plates were incubated at 42 °C for 48h in a microaerophilic atmosphere (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂). The typical colonies, which were spread and glistening, were submitted to morphotintorial classification by Gram stain.

Molecular identification

The DNA of the isolates was extracted according to Sambrook and Russel (2001) and stored at -18 °C. For complete cell lysis of the coagulase-positive *Sthaphylococcus* isolates, 100 µL of lysostaffin solution (100 µg/mL of lysostaffin in 20 mM acetate buffer) was added to the pellet obtained from the centrifugation of the culture in BHI and incubated at 37 °C for 1h.

To identify *S. aureus*, multiplex-PCR was performed, according to the protocol developed by Sasaki et al. (2010), which also allows the identification of *S. intermedius* and *S. hucus*, by probing the *nuc* gene. PCR was performed to identify *Y. enterocolitica*, according to Wannet et al. (2001), with modifications, since the *ail* gene was not assessed, and the corresponding primers were replaced by water. The PCR products stained with Diamond Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, United States of America) were visualized in 1% agarose gel electrophoresis (Panreac Química SA, Barcelona, Spain).

Identification of MRSA

To determine methicillin resistance in the *S. aureus* isolates, 30 µg of Cefoxitin (CFO) was used in the disk-diffusion test (Skov et al., 2003; Felten et al., 2002). The cultures in BHI were standardized in a spectrophotometer at 600 nm for 0.5 optical density (OD) corresponding to the concentration 108 CFU/mL. With the aid of sterile swabs the cultures were evenly distributed on the surface of a Mueller Hinton agar (Kasvi, Roseti Degli Abruzzi, Italy). The disc impregnated with Cefoxitin was disposed on the surface of the inoculated medium. The plates were incubated at 37 °C for 24h. Plate reading was performed by measuring and classifying the inhibitory halos according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2008), which establishes as resistant the isolates with inhibitory halos with diameters of less than or equal to 21 mm, and as sensitive the isolates with inhibitory halos equal to or greater than 22 mm of diameter.

Verification of biofilm formation

Biofilm production capacity of the *S. aureus* isolates was assessed by cultivation of colonies on Congo

Red Agar (CRA), using 0.8g of Congo Red dye (Exodus Cientifica, Sumaré, Brazil) diluted into 1 liter of agar Brain Heart Infusion (Himedia, Mumbai, India) and 50g of sucrose (Freeman et al., 1989). The inoculants were streaked on the agar and incubated at 37°C for 48h and then at 25°C for 48h (Mariana et al., 2009). Cultures that exhibited rough and black colonies were considered biofilm producers. A strain of *S. aureus* previously identified as a biofilm producer by Friedriczewski et al. (2018) was used as a positive control and the ATCC 14458 strain was used as a negative control, since it does not form biofilms.

The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA) of the Veterinary Faculty of the Universidade Federal de Pelotas under the registration code CEEA 2640-2014.

3. Results

Out of the 324 wild animals sampled, 212 (66%) were birds, 98 (30%) were mammals and 14 (4%) were reptiles. *S. aureus*, *Campylobacter sp.*, *Y. enterocolitica* and *S. enterica* were isolated from 51 (15.7%) animal species included in these three classes. Forty isolates were identified as *S. aureus*, which means that among the 324 animals collected, 12.3% bore this bacterium. Of these, 32 (80%) were identified as MRSA, which corresponds to 9.9% (32/324). A total of 72.5% of the isolates were able to form biofilm (Table 1).

Table 1 - Relation of animals that hosted *Staphylococcus aureus*, the sensitivity of the strain to cefoxitin (CFO), and biofilm formation capacity.

Class	Specie				
		Common name	Scientific name	Sensitivity to CFO	Biofilm formation
Aves	Brown-chested martin (1)		<i>Progne tapera</i>	R*	N***
	Brown-chested martin (2)		<i>Progne tapera</i>	R	F****
	Great kiskadee (1)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	F
	Great kiskadee (2)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	S**	F
	Great kiskadee (3)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	F
	Great kiskadee (4)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	S	F
	Great kiskadee (5)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	F
	Great kiskadee (6)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	F
	Great kiskadee (7)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	N
	Great kiskadee (8)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	F
	Great kiskadee (9)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	F
	Great kiskadee (10)		<i>Pitangus sulphuratus</i>	R	F
	Monk parakeet		<i>Myiopsitta monachus</i>	R	F
	Rusty-collared seedeater		<i>Sporophila collaris</i>	R	N

	American barn owl	<i>Tyto furcata</i>	R	N
	Great horned owl	<i>Bubo virginianus</i>	R	F
	Striped owl	<i>Asio clamator</i>	R	F
	Kelp gull	<i>Larus dominicanus</i>	R	F
	Short-tailed hawk	<i>Buteo brachyurus</i>	R	F
	Speckled teal	<i>Anas flavirostris</i>	R	F
	white-faced whistling duck (1)	<i>Dendrocygna viduata</i>	R	F
	white-faced whistling duck (2)	<i>Dendrocygna viduata</i>	R	F
	Campo flicker	<i>Colaptes campestris</i>	R	F
	Eared dove (1)	<i>Zenaida auriculata</i>	R	F
	Eared dove (2)	<i>Zenaida auriculata</i>	R	F
	Eared dove (3)	<i>Zenaida auriculata</i>	S	N
	Eared dove (4)	<i>Zenaida auriculata</i>	R	N
	Southern lapwing	<i>Vanellus chilensis</i>	R	F
	Rufous-bellied thrush	<i>Turdus rufiventris</i>	R	F
	Blue-and-yellow tanager	<i>Pipraeidea bonariensis</i>	S	N
	Fork-tailed flycatcher	<i>Tyrannus savana</i>	R	F
Mammalia	White-eared opossum (1)	<i>Didelphis albiventris</i>	S	N
	White-eared opossum (2)	<i>Didelphis albiventris</i>	S	F
	White-eared opossum (3)	<i>Didelphis albiventris</i>	R	F
	White-eared opossum (4)	<i>Didelphis albiventris</i>	S	F
	White-eared opossum (5)	<i>Didelphis albiventris</i>	S	N
	White-eared opossum (6)	<i>Didelphis albiventris</i>	R	F
	Capuchin monkey	<i>Sapajus apella</i>	R	F
	Coypu	<i>Myocastor coypus</i>	R	N
Reptilia	South American snake-necked turtle	<i>Hydromedusa tectifera</i>	R	N

* R = resistant, ** S = sensitive, *** N = not former, **** F = former. Source: Authors.

Y. enterocolitica was isolated from five (5.10%) of the 98 mammals collected, three (21.43%) of the 14 reptiles and two (0.94%) of the 212 birds. The animals from which this pathogen was isolated were four White-eared opossums (*Didelphis albiventris*), one Southern-tamandua (*Tamandua tetradactyla*), two D'Orbigny's sliders (*Trachemys dorbignyi*), one Hilaire's toadhead turtle (*Phrynops hilarii*), one Red-crested cardinal (*Paroaria*

coronata), and one Speckled teal (*Anas flavirostris*).

Salmonella was isolated from a single animal (0.67%), a bird of the species *Myiopsitta monachus*. *Campylobacter* was also isolated from a single bird (0.67%), of the species *Columbina talpacoti*.

4. Discussion

Occurrence of the pathogens in wild animals

Of the wild animals on rehabilitation sampled in this study, 15.7% carried some of the microorganisms surveyed. Hence, these animals offer a risk of spreading this pathogen into the environment, in addition to being potential sources of contamination for humans and other animals during their admission time in rehabilitation. Furthermore, some of the animals that are admitted in the rehabilitation centers are later released, returning to the natural environment. If they still bear pathogens in their intestines, these microorganisms can spread out into the wild after their release. Nunes et al. (2010) states that wild animals originated from captures and/or trafficking, which was the case of some animals sampled in this study, are potential transmitters of zoonosis if they host pathogens, even if they are healthy. Given this context, this kind of monitoring is of great relevance.

S. aureus

The occurrence of *S. aureus* was the most frequent. It was found in 12.3% of the fecal samples of wild animals of different classes, demonstrating that this microorganism is widely disseminated in the nature and adapts to different species of animals. The high percentage of isolation of *S. aureus* can be attributed to the characteristics of this pathogen, which is frequently found in the airways and gastrointestinal tract of animals and humans (Castro-Silva et al., 2011; Falcão et al., 2006), which are important routes for elimination of the pathogen.

MRSA

This is the first report of isolation of MRSA from feces of several species of wild animals of the Brazilian fauna. The presence of these animals carrying MRSA wildlife rehabilitation centers highlights the importance of hygienic-sanitary care by the handlers. Some groups of individuals who work closely to the animals, such as veterinarians, have high rates of MRSA colonization (Weese, 2010). Animals have been shown to be a source of human MRSA infection in some circumstances (Weese, 2010). The first methicillin-resistant strains were isolated from humans and farm animals (Morgan, 2008). Different MRSA can be distinguished based on epidemiological groups. Among other groups associated to humans, there is a group associated to hospital-acquired infections (Hospital-associated-MRSA - HA-MRSA) known for decades. Another MRSA, associated to livestock (Livestock-associated-MRSA - LA-MRSA) has emerged in recent years. In addition to being isolated from animals, it can also be isolated from humans (Catry et al., 2010). Porrero et al. (2013) suggested that the contamination of wild animals probably originated from livestock and/or humans. They are also the possible source of the contamination in the region of the present study.

Y. enterocolitica

It was not the first time that *Y. enterocolitica* was isolated in mammals, birds and reptiles in this rehabilitation center. Silveira et al. (2018), in 2014 and 2015, isolated *Y. enterocolitica* from feces of wild animals housed in the same center. These authors reported that out of 73 animals sampled, four (5.48%) hosted this pathogen. However, studies on the role of wild animals as carriers and disseminators of this pathogen are scarce.

Campylobacter

We considered the occurrence of this pathogen in wild animals as rare, after a single isolation from the 324 samples analyzed. This is the bacterium that causes the greatest number of diarrhea cases in developed and developing countries, and is frequently reported by health agencies in the United States (Centers for Disease Control and Prevention, 2017), but data addressing its occurrence in wild animals are scarce.

Salmonella

The *Salmonella* isolate obtained from a single sample was possibly a strain with high specificity to the host. It is already known that certain *Salmonella* variants seem to be specialized in hosts from certain species, as already described in pigeons (Smyser et al., 1972), ducks (Rabsch et al., 2002) and hedgehogs (Handeland et al., 2002). These variants present lower potential of infection and colonization of hosts from other species (Söderlund et al., 2019), which would corroborate to the rare occurrence observed.

Pathogens in wild birds

Carrier birds

It has been shown that *S. aureus* can be hosted by 17 different bird species (Table), and more frequently in some, such as *Pitangus sulphuratus*, *Zenaida auriculata*, *Progne tapera* and *Dendrocygna viduata*, a species already identified as a reservoir in a zoo in Germany (Febler et al. 2018). Febler et al. (2018) indicated as a reservoirs of *S. aureus* five other bird species: *Spatula discors*, *Cygnus atratus*, *Sibirionetta formosa*, *Haliaeetus albicilla* and *Milvus milvus*. Monecke et al. (2016) identified nine species as carriers: *Cygnus olor*, *Aquila chrysaetos*, *Haliaeetus albicilla*, *Strix aluco*, *Perdix perdix*, *Picus viridis*, *Pica pica*, *Corvus frigilegus* and *Parus major*, all captured in Germany, Austria and Sweden. Our results, when compared to the European reports, demonstrate that the wide distribution of *S. aureus* in wild birds observed in those regions also occur in Southern Brazil.

Although this is the first report of *Salmonella* isolated from *M. monachus*, an abundant psittacide of the region of the study (Timm and Timm, 2016), this pathogen has already been isolated from other species of wild birds in Brazil. Dias (2015), after collecting fecal samples from 214 wild birds of various species captured in the surroundings of poultry facilities in the extreme south of Brazil, observed the presence of *Salmonella* in *Sicalis flaveola*. The presence of *Salmonella* in wild birds was also identified in *Calidris fuscicollis* from the coastal region of the Rio Grande do Sul state (Gomes et al., 2015).

Campylobacter was isolated from a *C. talpacoti* chick. Studies in the same region indicate the occurrence of this microorganism in other passerines, *C. ruficapillus*, *S. flaveola* and *Zonotrichia capensis* (Rufous-collared sparrow) (Dias et al., 2014; Dias, 2015), all of which are free-living species, indicating that this group of birds is a possible reservoir. Like these species of passerines, *C. talpacoti* is a granivorous species (Hart, 2020) that tends to be present in environments next to human activities, seeking to benefit from the availability of food (Timm and Timm, 2016).

Y. enterocolitica was isolated from *P. coronata* and *A. flavirostris*. This pathogen had already been isolated from *Vanellus chilensis* and *Turdus rufiventris* by Silveira et al. (2018) in the same center, although in a sectional collection. Our results, when compared to the literature, demonstrate that wild birds in this rehabilitation center frequently host *Y. enterocolitica*. A specific serotype of *Y. enterocolitica* has been identified by Hicks et al. (2020) in routine cultures of a variety of species of wild animals housed in a zoo and aquarium in the United States. Animals of 12 species hosted *Y. enterocolitica*, but the birds were asymptomatic. The authors concluded that it was a single introduction of the pathogen in the zoo and subsequent dissemination, as the same strain was isolated

from all animals. This situation is different from that found in the center of the present study, where eventually carrier birds are detected, including those that had just been admitted to the center. In contrast, Castro-Silva et al. (2011) and Dias et al. (2019) assessed fecal samples from 92 and 189 wild birds in Brazil, respectively, and could not isolate *Y. enterocolitica*.

Dissemination of pathogens by birds

The bird species identified in the present study as hosts of pathogens of one health concern belong to different orders and families and have different living habits (Billerman et al., 2020), which can influence their potential to disseminate microorganisms. *Z. auriculata*, *P. tapera* and *M. monachus* are birds that usually live in flocks, being able to transmit pathogens to other birds in the flock and to the environment, in the areas that they fly over and take shelter. *C. talpacoti*, *P. sulphuratus*, *V. chilensis*, *Colaptes campestris*, *T. rufiventris*, *Sporophila collaris*, *Tyrannus savana*, *Anas flavirostris*, *D. viduata*, *Larus dominicanus* and *Pipraeidea bonariensis* are found in rural areas in search for food and shelter, and therefore, they may interact with domestic animals and people in these environments. On the other hand, *Tyto furcata*, *Bubo virginianus*, *Asio clamator* e *Buteo brachyurus* are more solitary birds, but there is still contact between animals, mainly through interactions with individuals of the same species. Emphasis should be given to migratory species, such as *Progne tapera* e *Tyrannus savana*, which have a much greater geographic dissemination potential, since they fly for longer distances.

Pathogens in wild mammals

Carrier mammals

The high occurrence of pathogens in mammal species under rehabilitation is considered an issue for human health (Wardyn et al., 2012). Six isolates of *S. aureus* and four isolates of *Y. enterocolitica* from *D. albiventris* were obtained, stressing the importance of this marsupial as a pathogen carrier. For the first time, *Myocastor coypus* and *Sapajus apella* were found carrying *S. aureus* and *T. tetradactyla* carrying *Y. enterocolitica*.

Four out of the eight (50%) isolates of *S. aureus* obtained from mammalian samples were sensitive to methicillin, that is, 28.6% (4/14) of the sampled mammals carried MRSA. In contrast, Espinosa-Gongora et al. (2012), in Denmark, observed that 100% of the *S. aureus* isolates obtained from the mammals they analyzed were methicillin sensitive, however the species they studied were not the same ones that we analyzed in this study. Porrero et al. (2013) analyzed samples from 1,342 free-living wild animals from different areas in Spain. The mammal species they sampled were *Cervus elaphus*, *Capra pyrenaica* and *Sus scrofa*. These authors found a low prevalence of MRSA: 13 isolates, obtained from 12 animals (0.89%). However, they stress that free-living wild animals can act as MRSA reservoirs and represent a potential risk for human health. Hence, the prevalence of 9.88% of MRSA found in animals collected in the rehabilitation center should be considered high.

Although the isolation of *Salmonella* from samples obtained from mammals and reptiles has not occurred in the rehabilitation center, this pathogen has already been isolated from the gastrointestinal tract of captive wild mammals in Brazil (Gomes et al., 2011). Sá and Solari (2001) isolated *Salmonella* in 39.1% of the Brazilian and imported reptiles they studied. Both studies obtained isolates from animals of species different from the aforementioned in the present study and were carried out in other Brazilian regions, which may have contributed to the different results found.

Dissemination by mammals

D. albiventris was the most frequent mammal in the center and also the main carrier of *S. aureus* and *Y. enterocolitica*. Silveira et al. (2018) considered *D. albiventris* to be an important reservoir and possible source of

dissemination of *Y. enterocolitica*, due to its vast eating habits and frequent contact with farm animals.

Despite of the prohibition of hunting, apprehensions of *M. coypus* from illegal hunting eventually occur in the region (Civil Police of the State of Rio Grande do Sul, 2019), denoting that the occurrence of this activity could facilitate the contact or consumption of the meat from contaminated animals. As for the presence of the pathogen in the primate species *S. apella*, there is a greater risk of direct contamination of humans during the rehabilitation period, due to the close proximity that this species usually requires for establishing sociable relationships with handlers. As for the animals that hosted *Y. enterocolitica*, the mammal *T. tetradactyla* is found predominantly in the rural area of the region and eventually at roadsides, with less likelihood of spreading diseases to humans when compared to other mammals bearing pathogens.

Pathogens in wild reptiles

Carrier reptiles

In our study, MRSA was isolated from *Hydromedusa tectifera*. The presence of *S. aureus* in animals in a zoo was studied by Espinosa-Gongora et al. (2012) in Copenhagen, Denmark. These authors did not isolate *S. aureus* from any of the 21 reptiles analyzed, considering them improbable hosts, which was contested by the results of our study. The differences in results seen between the two studies may be due to the distinct regions and species sampled, and also to the fact that the animals sampled in the present study were from a rehabilitation center and had a previous life outside of this center (free or in captivity) until the week they were sent to the center and sampled. *Y. enterocolitica* was isolated from the species *T. dorbigini* after the collection of 14 reptiles. This low occurrence suggests that reptiles act as occasional carriers of *Y. enterocolitica*. The samples were collected by the time the animals were admitted to the centers, demonstrating that the contamination occurred prior to rehabilitation. However, this pathogen has already been isolated in the same rehabilitation center from a single individual among 23 sampled reptiles. The animal of the species *Pantherophis guttatus* had been under care from the hatching of the egg (Silveira et al., 2018); therefore, the contamination of this snake certainly occurred within the center. The study by Silveira et al. (2018) was a one-off survey, with no monitoring of admittance of new animals in the center. Although other sources of contamination cannot be ruled out, the present study confirms the entry of *Y. enterocolitica* to the center via carrier animals, indicating that monitoring of animals upon arrival is an important measure to control the spread of microorganisms among the animals housed.

Dissemination by reptiles

The reptile species *T. dorbigini* and *P. hilarii* are commonly found in lakes, both in rural areas and in recreational squares in urban areas. Therefore, as carriers of *Y. enterocolitica* and MRSA they can spread these pathogens to other wild animals, domestic animals and even to humans, indirectly, in these environments.

Transmission possibilities

Sample collection was carried out when the animals were admitted or had been recently admitted to the rehabilitation center, which means that contamination by pathogens probably occurred prior to their contact with the environment, other animals or humans inside the center. Considering that many of the wild animals that were admitted to the rehabilitation center had previous contact with domestic animals and humans, this option should be considered as a possible source of contamination. However, environmental contamination should also be considered (de Sá and Ferreira, 2007), as some wild animals of free life arrive at the center without having had previous contact with humans and domestic animals.

According to Steele et al. (2005), the contamination of animals and humans by pathogens in rehabilitation

centers can be avoided, since these microorganisms are disseminated, in most instances, via the fecal-oral route. This spread can be reduced with proper hygiene, handling and disinfection of facilities and equipment. Thus, the results of this study are an important tool to define strategies for controlling the transmission of pathogens by wild animals.

Isolates capable of forming biofilm

The 72.5% of the isolates of *S. aureus* being capable to form biofilm is highly significant, as it can generate difficulties in the disinfection of facilities and cages. The ability to form biofilms promotes the persistence of the pathogen in the environment (Archer et al., 2011). When it is present in wildlife rehabilitation centers, the ability to form biofilms increases the risk of contamination infection of animals and humans. In this condition, the bacteria are less susceptible to the action of antibacterials and can reach a sufficient number to represent a potential infectious dose (Davies, 2003).

Of the 29 biofilm-forming isolates, 25 (86.2%) were MRSA, which demonstrates that strains of *S. aureus* with both biofilm formation capacity and antimicrobial resistance can be isolated from wild animals undergoing rehabilitation. This double capacity, biofilm formation and antibiotic resistance of *S. aureus* isolates, was also observed by Chen et al. (2020). After a study characterizing isolates obtained from veterinary hospitals in Guangzhou, China, from samples of domestic animals and animals from other sources, these authors observed, as in our study, that the occurrence of MRSA strains and strains able to form biofilms in animals under treatment/rehabilitation is frequent.

5. Conclusion

A wide diversity of animal species in rehabilitation centers, including birds, mammals and reptiles, can carry and eliminate *S. aureus* (MRSA and biofilm-forming strains) in the feces. *D. albivens*, *T. dorbigini*, *P. hilarii*, *T. tetradactyla*, *P. coronata* and *A. flavirostris* can carry *Y. enterocolitica*, *C. talpaci* can carry *Campylobacter* sp. and *M. monachus*, *Salmonella enterica*.

The presence of these pathogens of one health concern in the gastrointestinal tract of wild animals admitted to wildlife rehabilitation centers shows the importance of microbiological monitoring of animals at the time they are admitted and reinforces the need for specific hygienic-sanitary care, to avoid dissemination through the environment and transmission to humans and other animals.

Future directions in controlling the presented bacteria, point to the need for biofilm control studies (such as which sanitizers are effective in controlling pathogens in places that house animals), as well as which hygienic-sanitary measures would be effective in reducing the risk of transmission to both other animals, and human beings. On the other hand, phylogenetic studies of pathogens housed by wild animals are necessary to better understand how their dissemination occur. Only by understanding this, will it be possible to efficiently control the spreading of pathogens by - and for - wild animals.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Financial Code 001.

References

- Andrews, W. H., Andrew, J. & Hammack, T. (2014). *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 5, 2014. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E. & Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445–459.
- Billerman, S. M., Keeney, B. K., Rodewald, P. G. & Schulenberg, T. S. (2020). Birds of the World. Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY, USA. Retrieved from <https://birdsoftheworld.org/bow/home>
- Castro-Silva, M. A., Manoel, F. C., Krueger, J., Barreiros, M. A. B. & Branco, J. O. (2011). Identificação de bactérias potencialmente patogênicas a humanos presentes em *Sula leucogaster* (Suliformes: Sulidae), no litoral de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 19(4), 520-524.
- Catry, B., Van Duijkeren, E., Pomba, M. C., Greko, C., Moreno, M. A., Pyörälä, S., Ruz Auskas, M., Sanders, P., Threlfall, E. J., Ungemach, F., Torneke, K., munoz-madero, C. & Törneke, K. (2010). Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiology and Infection*, 138(5), 626-644.
- Centers for Disease Control and Prevention – CDC. 2017. Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR. Notifiable Diseases and Mortality Tables. Retrieved from https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6650md.htm?s_cid=mm6650md_w
- Chambers, H. F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 178.
- Chen, L., Tang, Z. Y., Cui, S. Y., Ma, Z. B., Deng, H., Kong, W. L., Yang, L. W., Lin, C., Xiong, W. G. & Zeng, Z. L. (2020). Biofilm Production Ability, Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* from Various Veterinary Hospitals. *Pathogens*, 9(4), 264.
- CLSI. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costa, H. C. & Bérnuls, R. S. (2015). Répteis brasileiros: lista de espécies 2015. *Herpetologia Brasileira*, 4(3), 75-93.
- De Sá, M. I. & Ferreira, C. (2007). Importância das zoonoses na segurança alimentar. Retrieved from <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-14-17.pdf>
- Dias, P. A., Wilsmann, D. E., Heinen, J. G., Corsini, D. F., Calabuig, C. & Timm, C. D. (2014). Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) silvestres. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 73, 368-71.
- Dias, P. A. (2015). *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em aves silvestres e frangos de corte. 55f. Pelotas – RS. Tese (Doutorado em Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- Dias, P. A., Moraes, T. P., Wilsmann, D. E., Ferrasso, M. M., Marinheiro, M. F., Heinen, J. G., Calabuig, C. I. P. & Timm, C. D. (2019). Ocorrência de *Campylobacter* e Enterobacteriaceae em aves silvestres e frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(1), 225-231.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114-122.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. M. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.

- Espinosa-Gongora, C., Chrobak, D., Moodley, A., Bertelsen, M. F. & Guardabassi, L. (2012). Occurrence and distribution of *Staphylococcus aureus* lineages among zoo animals. *Veterinary Microbiology*, 158(1-2), 228-231.
- Falcão, J. P., Falcão, D. P., Pitondo-Silva, A., Malaspina, A. C. & Brocchi, M. (2006). Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 55(11), 1539-1548.
- Febler, A. T., Thomas, P., Mühlendorfer, K., Grobello, M., Brombach, J., Eichhorn, I., Monecke, S., Ehricht, R. & Schwarz, S. (2018). Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from zoo and wild animals. *Veterinary Microbiology*, 218, 98-103.
- Felten, A., Grandry, B., Lagrange, P. H. & Casin, I. (2002). Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2766-2771.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R. & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874.
- Friedriczewski, A. B., Gandra, E. Á., Cereser, N. D., Moreira, L. M. & Timm, C. D. (2018). Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46(1), 1-6.
- Gomes, C. M. B., Batista K. S., Oliveira, S. A. & Bezerra L. M. (2011). Determinação de enterobactérias de mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 11(2), 74-80.
- Gomes, S., De Macedo, M. R. P., Pesenti, T., Pereira, D. I. B., Cirne, M. P. & Müller, G. (2015). Isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* em *Calidris fuscicollis* (Aves: Scolopacidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Ornithologia*, 8(1), 43-45.
- Handeland, K., Refsum, T., Johansen, B. S., Holstad, G., Knutsen, G., Solberg, I., Schulze, J. & Kapperud, G. (2002). Prevalence of *Salmonella Typhimurium* infection in Norwegian hedgehog populations associated with two human disease outbreaks. *Epidemiology and Infection*, 128(3), 523-7.
- Hart, J. A. (2020). Ruddy Ground Dove (*Columbina talpacoti*), version 1.0. In *Birds of the World*. T. S. Schulenberg, Editor. Ithaca: Cornell Lab of Ornithology.
- Hicks, C. L., Napier, J. E., Armstrong, D. L., Gladney, L. M., Tarr, C. L., Freeman, M. M. & Iwen, P. C. (2020). Clonal spread of *Yersinia enterocolitica* 1B/O: 8 in multiple zoo species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 51(1), 170-176.
- Mariana, N. S., Salman, S. A., Neela, V. & Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(6), 330-338.
- Monecke, S., Gavier-Widén, D., Hotzel, H., Peters, M., Guenther, S., Lazaris, A., Loncaric, I., Müller, E. & Reissig, A. (2016). Diversity of *Staphylococcus aureus* isolates in European wildlife. *Plos One*, 11(12), e0168433.
- Morgan, M. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1181-1187.
- Nunes, H., Rocha, F. L. & Cordeiro-Estrela, P. (2017). Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. *Urban Ecosystems*, 20(4), 953-969.

- Oliveira, S. D., Rodenbusch, C. R., Cá, M. C., Rocha, S. L. S. & Canal, C. W. (2003). Evaluation of selective and nonselective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*, 36(4), 217–221.
- Paglia, A. P., Fonseca, G. A. B., Rylands, A. B., Herrmann, G., Aguiar, L. M. S., Chiarello, A. G., Leite, Y. L. R., Costa, L. P., Siciliano, S., Kierulff, M. C. M., Mendes, S. L., Tavares, V. C., Mittermeier, R. A. & Patton, J. L. (2012). Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. Occasional Papers in Conservation Biology nº 6. 2°ed. Conservation International: Arlington, 76p.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica.[e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Retrieved from https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf.
- 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. (2015). Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 23(2), 91-298.
- Polícia Civil do Estado do Rio Grande do Sul. 2019. Operação Bad Hunters investiga crimes de caça ilegal de animais silvestres no norte gaúcho. Retrieved from <https://www.pc.rs.gov.br/operacao-bad-hunters-investiga-crimes-de-caca-ilegal-de-animal-silvestres-no-norte-gaucho>
- Porrero, M. C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Gómez-Barrero, S., Navarro-Gonzalez, N., Serrano, E., Casas-Díaz, E., Marco, I., Fernández-Garayzabal, J. F., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S. & Domínguez, L. (2013). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. *The Veterinary Journal*, 198(1), 127-130.
- Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L. G. & Bäumler, A. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infection and Immunity*, 70(5), 2249- 55.
- Rubini, S., Ravaioli, C., Previato, S., D'Incau, M., Tassinari, M., Guidi, E. & Bergamini, M. (2016). Prevalence of *Salmonella* strains in wild animals from a highly populated area of north-eastern Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 52(2), 277-280.
- Sá, I. V. A. D., & Solari, C. A. (2001). *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(4), 293-297.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3°ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 999 p.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T. & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 765-769.
- Silva, H. R., Rocha, Á. S. C., Rocha, M. V. S., Veras, D. M., de Sousa, O. M. C., da Costa Sousa, G., Almeida, D. F., Oliveira, A. L. P., Bezerra, G. S. S., Ribeiro, D. A. S., Pereira N. M., Alves, A. K. R., Silva, B. B. L., Nogueira, F. D., Rodrigues, F. L. G. & Pessoa, G. T. (2020). Reflexo do desequilíbrio ambiental na saúde: bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar. *Research, Society and Development*, 9(8), e220985604-e220985604.
- Silveira, D. R., Milan, C., Ferrasso, M. M., Dias, P. A., Moraes, T. P., Bandarra, P. M., Minello, L. F. & Timm, C. D. (2018). *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* isoladas de animais silvestres em um centro de reabilitação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(9), 1838-1843.
- Skov, R., Smyth, R., Clausen, M., Larsen, A. R., Frimodt-Møller, N., Olsson-Ljungquist, B. & Kahlmeter, G. (2003). Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), 204-207.

- Smyser, C. F. & Snoeyenbos, G. H. (1972). A pigeon host-adapted type of *Salmonella* typhimurium var. Copenhagen. *Avian diseases*, 16(2), 270-277.
- Söderlund, R., Jernberg, C., Trönnberg, L., Pääjärvi, A., Ågren, E. & Lahti, E. (2019). Linked seasonal outbreaks of *Salmonella* Typhimurium among passerine birds, domestic cats and humans, Sweden, 2009 to 2016. *Eurosurveillance*, 24(34), 1-10.
- Steele, C. M., Brown, R. N. & Botzler, R. G. (2005). Prevalence of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the Pacific Coast of California and Washington, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 735-744.
- Timm, C. D., Dias, P. A., Conceição, R. C. S., Lima, H. G., Silveira, D. R. (2016). Manual de técnicas microbiológicas em leite e derivados. Pelotas: Ed. do autor, 88 p.
- Timm, C. D. & Timm, V. F. (2016). Aves do extremo sul do Brasil: guia de identificação. Pelotas: Useb. 334 p.
- Tompkins, D. M., Carver, S., Jones, M. E., Krkošek, M. & Skerratt, L. F. (2015). Emerging infectious diseases of wildlife: a critical perspective. *Trends in Parasitology*, 31(4), 149-159.
- Wannet, J. B. W., Reessink, M. & Brunings, H. A. (2001). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive Duplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4483-4486.
- Wardyn, S. E., Kauffman, L. K. & Smith, T. C. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Iowa wildlife. *Journal of wildlife Diseases*, 48(4), 1069-1073.
- Weagant, S. D. & Feng, P. (2017). *Yersinia enterocolitica*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 8, 2017. Retrieved from URL <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch>
- Weese, J. S. & Van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 418-429.
- Yabsley, M. J. (2019). The Role of Wildlife Rehabilitation in Wildlife Disease Research and Surveillance. Medical Management of Wildlife Species: A Guide for Practitioners, p. 159-165, 2019.

4.3 Artigo 3

Bats that inhabit human buildings are reservoirs of bacteria of public health concern

Débora Rodrigues Silveira, Thamíris Pereira de Moraes, Kauana Kaefer, Luiz Gustavo Bach, Mauro Cezar Mayato Neto, Adeline Dias Franco, Ana Maria Rui e Cláudio Dias Timm

Submetido à revista Ecohealth

Bats that inhabit human buildings are reservoirs of bacteria of one health concern**ABSTRACT**

This study aimed to assess the presence of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* spp. in feces of bats that inhabit buildings, and also to determine the occurrence of common strains among bats of different species and roosts. Fecal samples were collected from 138 bats located at seven different roosts in buildings from southern Brazil. All isolates were obtained by traditional microbiological techniques. The identification and/or confirmation of the species, and comparison of the molecular profiles of isolates, were carried out by PCR and rep-PCR, respectively. *S. aureus* was isolated in 12.32% (17/138) of the samples, and *Y. enterocolitica* in 4.35% (6/138) of them. Fourteen isolates obtained from feces of *Tadarida brasiliensis*, two of *Molossus molossus*, and one of *Histiotus velatus* were identified as *S. aureus*. Out of those, 12 (70.59%) were resistant to methicillin. *Yersinia enterocolitica* was detected in six individuals of *T. brasiliensis*, in only one roost. Furthermore. Strains indistinguishable by rep-PCR indicated intra and interspecific transmission of *S. aureus* between bats and roosts. The obtained data highlight the role of bats in the dissemination and perpetuation of the pathogens studied, indicating the need for monitoring and management of bat populations.

key words: Chiroptera, *Tadarida brasiliensis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, bacteria transmission.

Bats that inhabit human buildings are reservoirs of bacteria of one health concern

Introduction and purpose

Several wild animals act as reservoir of microorganisms that threaten the health of humans and domestic animals. Conversely, pathogens of domestic animals and humans can infect free-living species, which allows the dissemination of these pathogens through the environment, and constitutes a risk to the preservation of biodiversity (Daszak et al., 2000).

Many species of chiropterans have a strong ecological association with humans, using buildings or human-made structures as permanent, or temporary, shelters for breeding and hibernation. Large colonies can be formed inside of buildings, which provide direct benefits to bats, such as advantages in obtaining food and roost (Voigt et al., 2016). However, this coexistence may offer some risks to humans and domestic animals, one of which is the transmission of diseases (Vandzurova et al., 2013).

According to Mühldorfer (2013), bats are considered potential reservoirs and vectors of pathogens that cause zoonosis. Research activities have been predominantly focused on viral agents (Calisher et al., 2006; Islam et al., 2020; Kuzmin et al., 2011; Wong et al., 2011), though the occurrence of bacteria in bats has not been widely studied. Little is known about bacterial transmission cycles involving bats, humans, and other animals. However, some studies have found *S. aureus* (Walther et al., 2008), *Yersinia* (Mühldorfer et al., 2010), *Pasteurella* (Mühldorfer et al., 2011), *Salmonella* (Adesiyun et al., 2009; Reyes et al., 2011) and *Escherichia coli* (Adesiyun et al., 2009) in bats.

Staphylococcus can cause a wide range of infections in both humans and animals, whether domestic or free-living (Held et al., 2016). *Staphylococcus aureus* sensitive to cefoxitin, has already been isolated from fecal samples from the bat species *Eidolon helvum* in Nigeria and probably certain mammal species acts as reservoirs in Africa (Akobi et al.,

2012). *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus schweitzeri*, have been recently established as novel coagulase-positive species within the *S. aureus* complex (Becker et al., 2019). *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp. are responsible for the occurrence of gastrointestinal syndromes in humans (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2019a,b). The existence of asymptomatic carriers contributes to the spread of this microorganism, which increases its one health concern (Shinohara et al., 2008). Both microorganisms have already been isolated from bats, *Y. enterocolitica* in *Pipistrellus pipistrellus* in Germany (Mühldorfer et al., 2011) and *Salmonella* from *Pteropus giganteus* feces in Pakistani parks (Gulraiz et al., 2017).

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major cause of nosocomial infection, culminating in a variety of life-threatening complications (Chambers, 2001). Some strains of MRSA have few limitations on host specificity, being able to colonize and cause infections in several species. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) has been known for decades as human pathogens. Which are classified as such, when they have probably been contracted in the human health system in specific situations (Salgado et al., 2003). In 2004, MRSA emerged in farm animals, possibly originated from humans. The main isolated strain came from cattle, called livestock-associated MRSA (LA-MRSA). People that are in direct contact with animals with LA-MRSA have an increased risk of also becoming carriers (Graveland et al., 2011). Another important strain is associated with pigs, and has been isolated from cattle and poultry (Van Loo et al., 2007). The evolution of methicillin resistance by *S. aureus* is associated with low-affinity to β-lactam antibiotics. Moreover, methicillin-resistant isolates are also resistant to most commonly used antimicrobials (Utsui & Yokota, 1985). Like any other group of microorganisms, it is that they will adapt to new environments and, over time, may increase their potential for colonization. Continuous surveillance on MRSA in humans and animals

is necessary to detect changes in the epidemiology and to implement effective control measures (Graveland et al., 2011).

Bats may become colonized by various microorganisms through their diet and environmental sources (Kuzmin et al., 2011; Wong et al., 2011). However, the epidemiological importance of humans and domestic animals in this infection is poorly understood. The occurrence and identification of similar strains of human pathogens in individuals, and colonies of different species generates important information for understanding the forms of transmission of the etiological agents (Mühldorfer, 2013). This study aimed to assess the presence of coagulase-positive species within the *S. aureus* complex, including MRSA, *Y. enterocolitica*, and *Salmonella* spp. in the feces of bats that inhabit buildings, and to determine the occurrence of common strains among bats of different species and roosts.

Materials and methods

Sample collection

Bats were captured in seven different roosts located at buildings on the municipality of Capão do Leão ($31^{\circ}48'07''S$, $52^{\circ}25'04''W$; $31^{\circ}47'17''S$, $52^{\circ}30'53''W$), in southern Brazil, between April and June, 2018. Bats were captured with mist nets or harp traps placed next to the area where they leave the roost for foraging at dusk. Eighteen to twenty bats were captured per roost, totalizing 138 individuals. Fecal samples were obtained by rectal swabs. Bats were identified taxonomically according to Tavares et al. (2008), and released immediately. The samples were placed into Cary Blair transport medium (CB, Himedia, Mumbai, India), and immediately sent to the laboratory - on ice, in isothermal boxes.

Isolates obtention

Rectal swabs with fecal samples were directly spread on Baird-Parker agar (BP, Himedia), and incubated at 37 °C for 48 h, for determination of coagulase-positive *Staphylococcus*. Three typical colonies of *S. aureus* and three atypical colonies were inoculated in Brain and Heart Infusion broth (BHI, Himedia), and incubated at 37 °C for 24 h to perform the coagulase test. In this test, 0.3 ml of culture was inoculated in 0.3 ml of blood plasma for 6 h at 37 °C monitoring the clot formation.

To assess *Y. enterocolitica*, streaking was performed on MacConkey agar (MC, Himedia). After incubation at 37 °C for 48 h, three lactose negative colonies were spread in BHI and incubated at 37 °C for 24 h. Then, motility tests were performed (Weagant & Feng, 2017).

To detect *Salmonella* spp., swabs were placed in 10 mL of Buffered Peptone Water (BPW, Acumedia) for pre-enrichment and further procedures, as recommended by the U.S. Food and Drug Administration - FDA (Andrews et al., 2014).

BHI cultures of the isolates were mixed with 20% glycerol and kept at -18 °C. When necessary, the isolates were recovered in BHI at 37 °C, for 24 h.

Molecular identification

For complete cell lysis of the coagulase-positive *Staphylococcus* isolates, 100 µL of lysostaffin solution (100 µg/mL of lysostaffin in 20 mM acetate buffer) was added to the pellet obtained from centrifugation of the culture in BHI, and incubated at 37 °C for 1h. DNA extraction was performed, according to Sambrook and Russel (2001), and stored at -18 °C.

To identify coagulase-positive species within the *S. aureus* complex, multiplex-PCR was performed according to the protocol described by Sasaki et al. (2010), which also allows the identification of *S. intermedius* and *S. hyicus*, by seeking for the presence of the *nuc* gene.

PCR was performed to identify *Y. enterocolitica* according to Wannet et al. (2001), with modifications - the *ail* gene was not assessed in our study, and the corresponding primers were replaced by water - PCR products were stained with Diamond Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, USA), and visualized in 1% agarose gel electrophoresis (Panreac Química SA, Barcelona, Spain).

Comparison of molecular profiles

The molecular profiles of the isolates of each species were analyzed using the Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) using the primer (GTG)5, and following the protocol described by Versalovic et al. (1994) with adaptations in the annealing temperature. The temperatures used were 45°C (*Y. enterocolitica*) and 40°C (*S. aureus*), for 1 min. For the visualization of the band patterns of the different amplicons, the rep-PCR products were stained with Diamond Nucleic Acid Dye, and submitted to electrophoresis in 1.5% agarose gel. The band profiles obtained were analyzed comparatively according to Tenover et al. (1995).

MRSA identification

To determine the resistance of *S. aureus* complex isolates to methicillin, 30 µg of Cefoxitin (CFO) was used in the disk-diffusion test (Skov et al., 2003; Felten et al., 2002). The BHI cultures were standardized in a spectrophotometer at 600 nm for 0.5 Optical Density (OD) which corresponds to 10⁸ CFU/mL and, with the aid of sterile swabs, were evenly distributed on the Mueller Hinton agar surface (MH, Kasvi, Roseti Degli Abruzzi, Italy). The disc impregnated with cefoxitin was placed on the surface of the inoculated medium. *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 43300 were used as negative and positive controls, respectively. The plates were incubated at 37 °C for 24h, and the reading

was performed by measuring and classifying the halos according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2015), which establishes as resistant those isolates with inhibitory halos ≤ 21 mm, and sensitive, the isolates with halos ≥ 22 mm.

Ethics approval

The study was authorized by the Ethics Committee on Animal Experimentation at the Federal University of Pelotas, CEEA (0978-2016). The capture of wild animals was authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) (52646-1).

Results

The most captured bat species was *Tadarida brasiliensis* (130/138), followed by *Histiotus velatus* (4/138), *Molossus molossus* (3/138) and *Eptesicus brasiliensis* (1/138). *Tadarida brasiliensis* and *M. molossus* are species of the family Molossidae, whereas *H. velatus* and *E. brasiliensis* belong to Vespertilionidae. The number of individuals captured in each roost, and the microorganisms isolated from fecal samples are presented in Table 1.

Table 1: Bats carrying bacteria that inhabit buildings in Capão do Leão-RS, Southern Brazil.

Roost site	Bat species†	Total number of captured individuals	Number of bats carrying each bacteria		
			<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> complex	<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i> spp.
1	<i>T. brasiliensis</i>	17	2 (2)	-	-
	<i>M. molossus</i>	3	1 (1)	-	-
2	<i>T. brasiliensis</i>	19	2 (-)	-	-
	<i>H. velatus</i>	1	-	-	-
3	<i>T. brasiliensis</i>	20	-	-	-
4	<i>T. brasiliensis</i>	14	4 (4)	-	-
	<i>M. molossus</i>	3	1 (1)	-	-
	<i>E. brasiliensis</i>	1	-	-	-
5	<i>T. brasiliensis</i>	17	1 (1)	-	-
	<i>H. velatus</i>	3	1 (1)	-	-
6	<i>T. brasiliensis</i>	20	3 (2)	-	-
7	<i>T. brasiliensis</i>	20	2 (1)	6	-

†*Tadarida brasiliensis*, *Molossus molossus*, *Histiotus velatus*, *Eptesicus brasiliensis*

‡ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Of the 138 samples analyzed, 17 (12.3%) isolates obtained from bat feces of the species *Tadarida brasiliensis* (14), *Molossus molossus* (two), and *Histiotus velatus* (one) were identified as coagulase-positive species within the *S. aureus* complex. Of these, 13 (76.5%)

were resistant to cefoxitin, among which nine were from the species *T. brasiliensis*, two from *M. molossus* and one from *H. velatus*. *Yersinia enterocolitica* was detected in six individuals of *T. brasiliensis*, only in the same roost site.

Seventeen *S. aureus* complex isolates (obtained from the feces of 17 bats of the species *T. brasiliensis*, *M. molossus* and *H. velatus*) from six different roosts, and nine isolates of *Y. enterocolitica* (obtained from of feces of six bats of the species *T. brasiliensis*) from one of the roosts were used for the analysis of the molecular profiles. Since the number of *Y. enterocolitica* isolates obtained from bats was lower, more than one isolate from each individual was analyzed.

The molecular profiles of *S. aureus* complex isolates demonstrate that indistinguishable strains are common among different animals and different roosts (Fig. 1). However, different bats from the same roost carried only distinct strains of *Y. enterocolitica*, and no common strains were detected (Fig. 1).

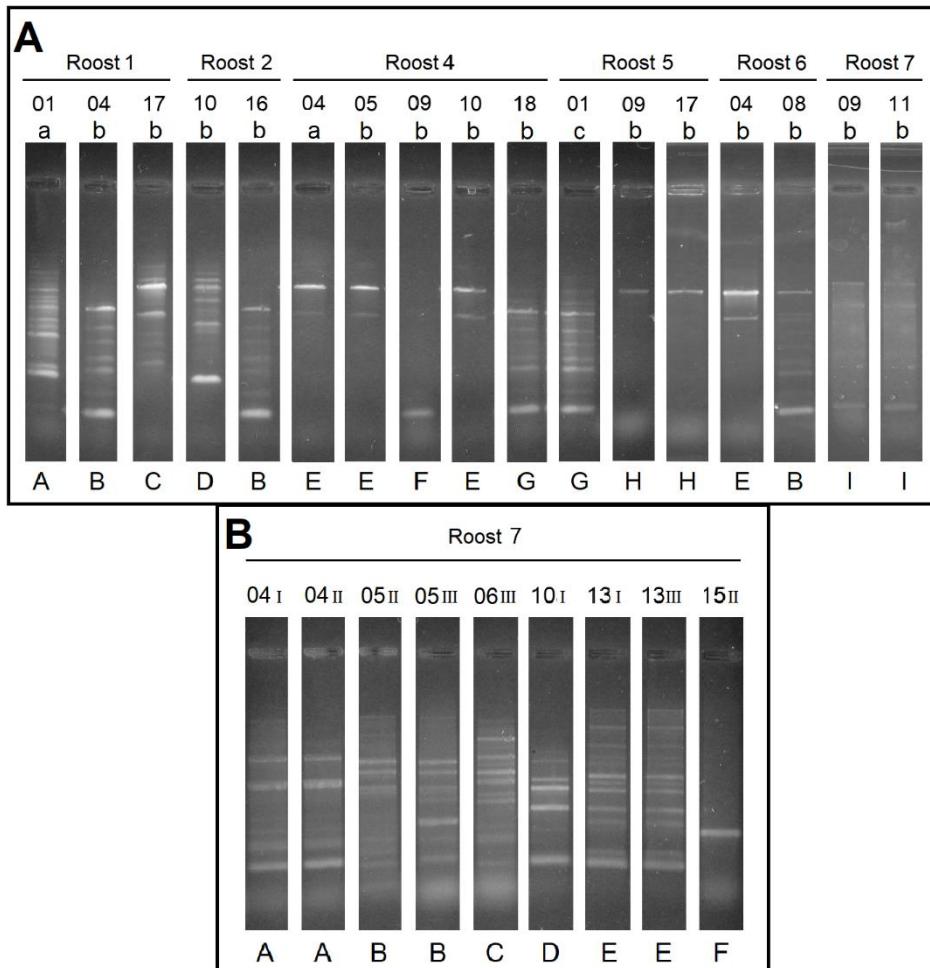


Fig. 1: Agarose gel (1.5%) after horizontal electrophoresis of products amplified in PCR of repetitive elements (rep-PCR) stained with Diamond. A: isolates of *Staphylococcus aureus* complex obtained from fecal samples of *Molossus molossus* (a), *Tadarida brasiliensis* (b) and *Histiotus velatus* (c), captured in six roost sites. The number corresponds to each animal collected and the profiles are grouped by capital letters according to similarity; B: isolates of *Yersinia enterocolitica* obtained from fecal samples of *Tadarida brasiliensis* inhabiting the same buildings. The numbers correspond to each animal collected and the roman number corresponds to the isolate; the profiles are grouped by capital letters according to similarity.

Discussion

Bats as carriers of coagulase-positive species within the *S. aureus* complex and MRSA

This is the first study that identifies bats of the species *T. brasiliensis*, *M. molossus* and *H. velatus* as carriers of coagulase-positive species within the *S. aureus* complex, and MRSA. Although reports are scarce, *S. aureus* has been isolated from other bat species, in a lower frequency than in our study (12.3%). In Brazil, *S. aureus* was detected in 2.6% of 113 bats of several species of the Atlantic Forest. The carrier species were *Desmodus rotundus*, *Anoura caudifer*, and *Anoura geoffroyi* (Cláudio et al., 2018). In Gabon, *S. aureus* was isolated from *Rousettus aegyptiacus* and *Micropteropus pusillus* with a prevalence of 3% (4/133) (Held et al., 2016). In these two studies, the species carrying *S. aureus* were hematophagous, nectarivorous, and frugivorous, unlike our study in which the species are insectivorous. In addition, the two previous studies were performed with wildlife bats, not in the urban area, highlighting the importance of this type of research.

In the present study, we demonstrated that 9.4% (13/138) of bats that inhabit buildings may be carriers of MRSA. These data are alarming and should not be disregarded. An important characteristic of *S. aureus* is the possibility of developing resistance to methicillin, due to the presence of the *mecA* gene in the DNA, which encodes one of the main mechanisms of resistance described (Aarestrup et al., 2001). Previously, MRSA was only relevant in humans, but later it emerged in the veterinary field, which raised questions about the infection of animals by this pathogen, having humans considered the source of transmission (Loeffler et al., 2005; Weese & Van Duijkeren, 2010). The isolation of MRSA from bat feces raises the possibility that these animals have been contaminated due to contact with humans previously exposed to the microorganism. Possibly, the fact that bats cohabit buildings with humans favored contagion. Studies have reported that other species of *Staphylococcus*, such as *S. nepalensis* (Vandzurova et al., 2013) and *S. lugdunensis* (Newman et al., 2018), remain viable in fresh guano. It is likely that the same occurs with *S.*

aureus. Considering that the colonies of *T. brasiliensis* can be composed of a very large number of individuals (Luis et al., 2017), the guano produced may represent an important source of infection.

The occurrence of MRSA in bats has also been reported by Walther et al. (2008) in a study conducted in Germany. The bat, of an unidentified species, had wounds infected with MRSA, a situation completely different from that reported in our study, in which the pathogen isolation was performed on fecal samples of asymptomatic animals.

The nine different molecular profiles of *S. aureus* obtained from 17 bats (Fig. 1) demonstrate that indistinguishable strains may be present in individuals from different species (molecular profiles E and G) and different roosts (profiles B, E and G). Considering that roost 5 is about 9.5 km away from the other roosts (which are all located within a radius of about 500 m), this could either indicate the capacity for transmission of pathogens between bats over long distances, or the existence of infection sources, such as contaminated food and water, common to individuals from roosts that are far apart. The presence of indistinguishable *S. aureus* isolates among animals, roosts, and species may be explained by the habits of agglomeration, socialization, and interactions between bats (Luis et al., 2017; Nunes et al., 2017). Although isolated from feces, staphylococci are usually found on the nose, mouth or skin/fur. Therefore, social grooming can facilitate transmission between individuals (Walther et al., 2008).

A characteristic of *S. aureus* that can be attributed to its greater occurrence in bats is the fact that this microorganism is part of the normal microbiota of the skin and respiratory tract of a wide variety of animals, including bats. So, the infection of other animals may occur through direct contact (Parlet et al., 2019; Krismer et al., 2017; Fredriksson-Ahomaa, 2017). The analysis of molecular profiles of *S. aureus* obtained from feces of *T. brasiliensis*, *M. molossus* and *H. velatus* demonstrated the presence of common strains between different

bats, species, and roosts, indicating that there is transmission of *S. aureus* between bats in the same roost, between different bat species, and between bats from different roosts.

Bats as carriers of Y. enterocolitica

Bats are not usually reported as reservoirs of *Y. enterocolitica* because of the lack of studies considering this hypothesis. However, this microorganism was isolated from a bat of the insectivorous species *Pipistrellus pipistrellus* by Mühldorfer et al. (2010) in Germany. In the present study, *Y. enterocolitica* was isolated from fecal samples of another insectivorous bat species, *T. brasiliensis*. Bacterial isolates were not further characterized, the pathogenic potential is unknown.

The molecular profiles of *Y. enterocolitica* isolates demonstrate that only isolates obtained from the same animal were indistinguishable (Fig. 1). Isolates were considered distinct when compared between animals. Mühldorfer et al. (2010) speculated that the possible sources of infection for the bat were insects or contaminated water. Therefore, it should be considered that the infection possibly came from these sources, since the direct spread from one bat to another was not observed, according to the band profiles obtained. The same conclusion was reached by Silveira et al. (2018), who compared molecular profiles of *Y. enterocolitica* isolated from *Pantherophis guttatus* (Corn snake), *Didelphis albiventris* (Opossum), *Turdus rufiventris* (Rufous-bellied thrush) and *Vanellus chilensis* (Southern lapwing) kept in the same building and cared for by the same keepers, and found that different strains of *Y. enterocolitica* were present in each animal, with no transmission between them.

Unlike *S. aureus* isolates, *Y. enterocolitica* isolates seem to infect animals and remain in the gastrointestinal tract, with no greater potential for transmission and dissemination between animals and roosts, which may explain the lower prevalence of *Y. enterocolitica*.

compared with *S. aureus*. When *Y. enterocolitica* is present in the animal, it is usually limited to the intestine tract and, when there is gastroenteritis, the elimination through the feces is increased (Fredriksson-Ahomaa, 2017). Since the bats that carried the bacteria were apparently healthy, the possibility of direct dissemination between them was low, which could also have contributed to the lower occurrence. Distinct rep-PCR profiles of *Y. enterocolitica* isolates did not indicate bacterial transmission between bats.

Bats as not commonly carrier of Salmonella

In our study, *Salmonella* spp was not isolated from samples. *Salmonella* was isolated from bats of the species *Molossus rufus* (insectivore) and *Artibeus lituratus* (frugivore) in the Brazilian Atlantic Forest (Cláudio et al., 2018) after a study on 113 bats. Considerations for the non-isolation of *Salmonella* from the bats analyzed in our study are that this microorganism are known for intermittent shedding. They are detected rarely in the intestine or feces of bats in general, and has not been frequently isolated from wild animals in the southern region of Rio Grande do Sul State (Silveira et al., 2018). We emphasize that it can be tricky to establish definitive negative results with the studied sample size, especially for fastidious organisms such as *Salmonella*.

Conclusions

T. brasiliensis can be reservoir of *Y. enterocolitica*. *T. brasiliensis*, *M. molossus*, and *H. velatus* can be carriers of *S. aureus*, including MRSA. Both species can eliminate these bacteria in the feces, constituting an important potential source of infection for the environment and other animals, especially for human, since these species usually inhabit human constructions.

The analysis of the molecular profiles of *S. aureus* obtained from the feces of *T. brasiliensis*, *M. molossus* and *H. velatus* demonstrated the presence of common strains between different bats, species and roosts, indicating that there is transmission of *S. aureus* between bats in the same roost, between different bat species and between bats from different roosts. On the other hand, the results of molecular analyzes are suggestive of *T. brasiliensis* not transmitting *Y. enterocolitica* strains to each other. The occurrence of important pathogens, including MRSA, indicate the need for bat population monitoring and management in specific situations, in order to minimize the risks of pathogen transmission from humans to bats and vice versa.

References

- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F (2001) Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2054-2059.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.2054-2059.2001>
- Adesiyun AA, Stewart-Johnson A, Thompson NN (2009) Isolation of enteric pathogens from bats in Trinidad. *Journal of Wildlife Diseases* 45:952-961.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.4.952>
- Akobi B, Aboderin O, Sasaki T, Shittu A (2012) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from faecal samples of the straw-coloured fruit bat (*Eidolon helvum*) in Obafemi Awolowo University (OAU), Nigeria. *BMC Microbiology* 12:279.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-279>
- Andrews WH, Andrew J, Hammack T (2014) *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 5.
 Available:<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> [accessed Jan 25, 2021]
- Becker K, Schaumburg F, Kearns A, Larsen AR, Lindsay JA, Skov RL, Westh H (2019) Implications of identifying the recently defined members of the *Staphylococcus aureus* complex *S. argenteus* and *S. schweitzeri*: a position paper of members of the ESCMID Study

Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS). *Clinical Microbiology and Infection* 25:1064-1070. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.028>

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006) Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 19:531-545.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>

Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2019) *Yersinia enterocolitica* (Yersiniosis). Available:<https://www.cdc.gov/yersinia/faq.html> [accessed Jan 25, 2021]

Centers for Disease Control and Prevention - CDC (2019) *Salmonella*. Available:<https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html> [accessed Jan 25, 2021]

Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases* 7:178. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010204>

Cláudio VC, Gonzalez I, Barbosa G, Rocha V, Moratelli R, Rassy F (2018) Bacteria richness and antibiotic-resistance in bats from a protected area in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. *Plos one* 13:9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203411>

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443-449.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>

Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I (2002) Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology* 40:2766-2771.

<https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2766-2771.2002>

Fredriksson-Ahomaa M (2017) *Yersinia enterocolitica*. In: Foodborne Diseases. Academic Press, pp 223-233

Graveland H, Duim B, Van Duijkeren E, Heederik D, Wagenaar JA (2011) Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *International Journal of Medical Microbiology* 30:630-634.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.004>

Gulraiz TL, Javid A, Hussain SM, Shahbaz M, Daud S (2017) Microbial Analysis of Indian Flying Fox (*Pteropus giganteus*) Ejecta Collected from Two Public Parks in Lahore, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* 49:289-295.

<http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.1.289.295>

Held J, Gmeiner M, Mordmüller B, Matsiégui P, Schaer J, Eckerle I, Weber N, Matuschewski K, Bletz S, Schaumburg F (2016) Bats are rare reservoir of *Staphylococcus aureus* complex in Gabon. *Infection, Genetics and Evolution* 47:118-120.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.022>

Islam A, Hossain ME, Rostal MK, Ferdous J, Islam A, Hasan R, Miah M, Rahman M, Rahman MZ, Daszak P, Epstein JH (2020) Epidemiology and Molecular Characterization of Rotavirus A in Fruit Bats in Bangladesh. *EcoHealth* 17:398–405.
<https://doi.org/10.1007/s10393-020-01488-7>

Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A (2017) The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 15:675. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.104>

Kuzmin IV, Bozick B, Guagliardo SA, Kunkel R, Shak JR, Tong S, Rupprecht, CE (2011) Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerging Health Threats Journal* 4:7159. <https://doi.org/10.3402/ehtj.v4i0.7159>

Loeffler A, Boag AK, Lindsay JA, Lindsay JA, Guardabassi L, Dalsgaard A, Smith H, Stevens KB, Lloyd DH (2005) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:692-697. <https://doi.org/10.1093/jac/dki312>

Luis AD, Hayman DT, O'shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, Mills JN, Timonin ME, Willis CKR, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JLN, Webb CT

(2017) A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 20:953-969.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>

Mühldorfer K, Wibbelt G, Haensel J, Riehm J, Speck S (2010) *Yersinia* species isolated from bats, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 16:578.
<https://doi.org/10.3201/eid1603.091035>

Mühldorfer K, Speck S, Kurth A, Lesnik R, Freuling C, Müller T, Kramer-Schadt S, Wibbelt G (2011) Diseases and causes of death in European bats: dynamics in disease susceptibility and infection rates. *Plos One* 6:29773.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029773>

Mühldorfer K (2013) Bats and bacterial pathogens: a review. *Zoonoses and Public Health* 60:93-103. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x>

Newman MM, Kloepper LN, Duncan M, McInroy JA, Kloepper JW (2018) Variation in bat guano bacterial community composition with depth. *Frontiers in Microbiology* 9:1-9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00914>

Nunes H, Rocha FL, Cordeiro-Estrela P (2017) Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. *Urban Ecosystems* 20:953-969.
<https://doi.org/10.1007/s11252-016-0632-3>

Parlet CP, Brown MM, Horswill AR (2019) Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. *Trends in Microbiology* 27:497-507.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>

Reyes AWB, Rovira HG, Masangkay JS, Ramirez TJ, Yoshikawa Y, Baticados WN (2011) Polymerase chain reaction assay and conventional isolation of *Salmonella* spp. from Philippine bats. *Acta Scientiae Veterinariae* 39:1-7

Salgado CD, Farr BM, Calfee DP (2003) Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clinical Infectious Diseases* 36:131-139. <https://doi.org/10.1086/345436>

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3^oed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K (2010) Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 48:765-769.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01232-09>

Shinohara NKS, Barros VBD, Jimenez SMC, Machado EDCL, Dutra RAF, Lima Filho JLD (2008) *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva* 13:1675-1683

Silveira DR, Milan C, Ferrasso MM, Dias PA, Moraes TP, Bandarra PM, Minello LF, Timm CD (2018) *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* isoladas de animais silvestres em um centro de reabilitação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38:1838-1843. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4989>

Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Olsson-Liljequist B, Kahlmeter G (2003) Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:204-207. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg325>

Tavares VC, Gregorin R, Peracchi AL (2008) A diversidade de morcegos no Brasil: lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. Morcegos no Brasil: biologia, sistemática, ecologia e conservação. Porto Alegre: Armazém Digital

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33:2233-2239

Utsui Y, Yokota T (1985) Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin-and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 28:397-403. <https://doi.org/10.1128/AAC.28.3.397>

Van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, De Neeling A, Van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A, Kluytmans J (2007) Emergence of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus of animal origin in humans. *Emerging Infectious Diseases* 13:1834.

<https://doi.org/10.3201/eid1312.070384>

Vandzurova A, Backor P, Javorsky P, Pristaš P (2013) *Staphylococcus nepalensis* in the guano of bats (Mammalia). *Veterinary Microbiology* 164:116-121.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.043>

Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 5:25-40

Voigt CC, Phelps KL, Aguirre LF, Schoeman MC, Vanitharani J, Zubaid A (2016). Bats and buildings: the conservation of synanthropic bats. In: Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world. Springer: Cham, pp. 427-462

Walther B, Wieler LH, Friedrich AW, Hanssen AM, Kohn B, Brunnberg L, Lübke-Becker A (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations.

Veterinary Microbiology 127:171-178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.018>

Wannet JBW, Reessink M, Brunings HA (2001) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive Duplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 39:4483-4486. 10. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4483-4486.2001>

Weagant SD, Feng P (2017) *Yersinia enterocolitica* U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 8.

Available:<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch> [accessed Jan 25, 2021]

Weese JS, Van Duijkeren E (2019) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 140:418-429. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.039>

Wong LF, Walker PJ, Poon LL (2011) Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats ‘special’ as reservoirs for emerging viruses? *Current Opinion in Virology* 1:649-657. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>

5 Considerações Finais

Animais domésticos e silvestres atuam como carreadores de bactérias importantes em saúde única, destacando-se seu papel enquanto reservatórios de cepas MRSA, e podem eliminar esses microrganismos nas fezes, constituindo uma fonte potencial de contaminação para o meio ambiente e outros animais, incluindo o homem.

A espécie, *S. aureus*, inclusive MRSA, pode estar presente nas fezes de ambos os animais domésticos (suínos, felinos, aves, ovinos e bovinos) e silvestres (*S. flaveola*, *T. rufiventris*, *F. rufus*, *P. domesticus*, *T. brasiliensis*, *M. molossus*, *H. velatus* e uma grande diversidade de espécies animais em centros de reabilitação, incluindo aves, mamíferos e répteis). Felinos, caninos e aves domésticos, bem como *T. rufiventris*, podem ser portadores de *S. aureus* potencialmente enterotoxigênico. Animais silvestres em reabilitação podem ser portadores de *S. aureus* capazes de formar biofilme, dificultando a eliminação da bactéria. *S. aureus* foi a espécie mais presente dentre as pesquisadas em ambos os trabalhos.

As espécies *S. flaveola* *T. brasiliensis*, *D. albivens*, *T. dorbigini*, *P. hilarii*, *T. tetradactyla*, *P. coronata* e *A. flavirostris* podem carrear *Y. enterocolitica*, *C. talpaci* pode carrear *Campylobacter* sp., enquanto felino doméstico e *M. monachus* podem carrear *S. enterica*. Estes outros patógenos foram menos frequentes, com capacidade de transmissão menor ou quase nulas entre animais, no entanto, também merecem atenção para que se evite a transmissão para humanos.

A ocorrência de importantes patógenos, incluindo MRSA, indica a necessidade de monitoramento e manejo da população de morcegos em situações específicas, como quando alojados em locais que propiciam convívio com outros animais e seres humanos, de animais silvestres em interação com animais domésticos e de animais em reabilitação a fim de minimizar os riscos de transmissão do patógeno de humanos para animais silvestres e vice-versa.

Considerando-se a variedade de espécies, tanto domésticas quanto silvestres, que podem ser portadoras de bactérias de interesse para a saúde única, demonstrando o papel dos animais silvestres na perpetuação destas bactérias, torna-se necessário que medidas higiênico-sanitárias sejam adotadas, como manejo adequado dos animais e desinfecção periódica de ambientes, a fim de minimizar a possibilidade de transmissão desses microrganismos e de diminuir o risco de infecção.

Referências

- AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORG, H. D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R. S.; BAGER, F. Effect of abolition of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2054-2059, 2001.
- ADESIYUN, A. A.; STEWART-JOHNSON, A.; THOMPSON, N. N. Isolation of enteric pathogens from bats in Trinidad. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 4, p. 952-961, 2009.
- AKOBI, B.; ABODERIN, O.; SASAKI, T.; SHITTU, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from faecal samples of the straw-coloured fruit bat (*Eidolon helvum*) in Obafemi Awolowo University (OAU), Nigeria. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 279, 2012.
- ANDRETTA, Milimani. **Serro artisanal cheese produced in Brazil has a microbial safety status for consumers**. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.
- ANDREWS, W.H.; ANDREW, J.; HUA, W.; JACOBSON, A.; GE, B.; ZHANG, G.; HAMMACK, T. **Salmonella**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 5. 2020. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>> Acesso em: 24 nov 2020
- ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; LEID, J. G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- BASTOS, E. C. B.; COSTA, A. N. B.; DE SOUSA, P. D. L.; MOREIRA, N. S.; DE SOUSA, M. V. A.; ARAGÃO, B. P.; PAIVA, T. V.; DO NASCIMENTO, M. D. A. Prevalência de microrganismos isolados de hemoculturas em uma UTI adulto de um hospital de ensino no interior do Ceará. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 59043-59047, 2020.

BECKER, K.; SCHAUMBURG, F.; KEARNS, A.; LARSEN, A. R.; LINDSAY, J. A.; SKOV, R. L.; WESTH, H. Implications of identifying the recently defined members of the *Staphylococcus aureus* complex *S. argenteus* and *S. schweitzeri*: a position paper of members of the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 9, p. 1064-1070, 2019.

BILLERMAN, S. M.; KEENEY, B. K.; RODEWALD, P. G.; SCHULENBERG, T. S. (2020). **Birds of the World. Cornell Laboratory of Ornithology**, Ithaca, NY, USA. Disponível em: <<https://birdsoftheworld.org/bow/home>> Acesso em: 28 nov 2020.

CALISHER, C. H.; CHILDS, J. E.; FIELD, H. E.; HOLMES, K. V.; SCHOUNTZ, T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 531-545, 2006

CASTRO-SILVA, M. A.; MANOEL, F. C.; KRUEGER, J.; BARREIROS, M. A. B., BRANCO, J. O. Identificação de bactérias potencialmente patogênicas a humanos presentes em *Sula leucogaster* (Suliformes: Sulidae), no litoral de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 4, p. 520-524, 2011.

CATRY, B.; VAN DUIJKEREN, E.; POMBA, M. C.; GREKO, C.; MORENO, M. A.; PYÖRÄLÄ, S.; RUZ AUSKAS7, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E. J.; UNGEMACH, F.; TO RNEKE, K.; MUÑOZ-MADERO, C.; TÖRNEKE, K. Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. **Epidemiology & Infection**, v. 138, n. 5, p. 626-644, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 22, p. 749-55, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. 2017. **Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR**. Notifiable Diseases and Mortality Tables. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6650md.htm?s_cid=mm6650md_w> Acessado em: 28 nov 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION^a – CDC. 2019. ***Yersinia enterocolitica* (Yersiniosis)**. Disponível em:
<<https://www.cdc.gov/yersinia/faq.html>> Acessado em: 28 nov 2020.

Centers for Disease Control and Prevention^b – CDC. 2019. ***Salmonella***. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>> Acessado em: 28 nov 2020.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 178, 2001.

CHEN, L.; TANG, Z. Y.; CUI, S. Y.; MA, Z. B.; DENG, H.; KONG, W. L.; YANG, L. W.; LIN, C.; XIONG, W. G.; ZENG, Z. L. Biofilm Production Ability, Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* from Various Veterinary Hospitals. **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 264, 2020.

CLÁUDIO, V. C.; GONZALEZ, I.; BARBOSA, G.; ROCHA, V.; MORATELLI, R.; RASSY, F. Bacteria richness and antibiotic-resistance in bats from a protected area in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. **PloS one**, v. 13, n. 9, p. e0203411, 2018.

CLSI, CALSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. **M100-S24 January**, 2015.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, v. 4, n. 3, p. 75-93, 2015.

CUNHA, M. R. L. S.; CALSOLARI, R. A. O.; JÚNIOR, J. P. A. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 4, p. 381-390, 2007.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443-449, 2000.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114, 2003.

DE LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D.; TOMASZ, A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 5, p. 428-435, 2007.

DE SÁ, M. I.; FERREIRA, C. **Importância das zoonoses na segurança alimentar**. 2007. Online. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-14-17.pdf>>. Acesso em: 28 nov 2020.

DIAS, P. A.; WILSMANN, D. E.; HEINEN, J. G.; CORSINI, D. F.; CALABUIG, C.; TIMM, C. D. Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter spp.* isolados de Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) silvestres, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 368-71, 2014.

DIAS, Priscila Alves. ***Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em aves silvestres e frangos de corte**. 2015. 55f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

DIAS, P. A.; MORAES, T. P.; WILSMANN, D. E.; FERRASSO, M. M.; MARINHEIRO, M. F.; HEINEN, J. G.; CALABUIG, C. I. P.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Campylobacter* e Enterobacteriaceae em aves silvestres e frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 1, p. 225-231, 2019.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

ESPINOSA-GONGORA, C.; CHROBAK, D.; MOODLEY, A.; BERTELSEN, M. F.; GUARDABASSI, L. Occurrence and distribution of *Staphylococcus aureus* lineages among zoo animals. **Veterinary microbiology**, v. 158, n. 1-2, p. 228-231. 2012.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P.; PITONDO-SILVA, A.; MALASPINA, A. C.; BROCCHI, M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1539-1548, 2006.

FEBLER, A. T.; THOMAS, P.; MÜHLDORFER, K.; GROBBEL, M.; BROMBACH, J.; EICHHORN, I.; MONECKE, S.; EHRICHT, R.; SCHWARZ, S. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from zoo and wild animals. **Veterinary microbiology**, v. 218, p. 98-103, 2018.

FELTEN, A.; GRANDRY, B.; LAGRANGE, P. H.; CASIN I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2766-2771, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. 2017. *Yersinia enterocolitica*. In: SIMJEE, S. **Foodborne diseases**. Humana Press, 2007. p. 223-233

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.

FRIEDRICZEWSKI, A. B.; GANDRA, E. Á.; CERESER, N. D.; MOREIRA, L. M.; TIMM, C. D. Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 6, 2018.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P. M.L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2.ed. São Paulo: Editora Varela; 2003, p. 215-75. 2.

- GOMES, C. M. B.; BATISTA, K. S.; OLIVEIRA, S. A.; BEZERRA, L. M. Determinação de enterobactérias de mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 2, p. 74-80, 2011.
- GOMES, S.; DE MACEDO, M. R. P.; PESENTI, T.; PEREIRA, D. I. B.; CIRNE, M. P.; MÜLLER, G. Isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* em *Calidris fuscicollis* (Aves: Scolopacidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ornithologia**, v. 8, n. 1, p. 43-45, 2015.
- GRAVELAND, H.; DUIM, B.; VAN DUIJKEREN, E.; HEEDERIK, D.; WAGENAAR, J.A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 630-634, 2011.
- GREIG, J.; RAJIĆ, A.; YOUNG, I.; MASCARENHAS, M.; WADDELL, L.; LEJEUNE, J. A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. **Zoonoses and public health**, v. 62, n. 4, p. 269-284, 2015.
- GULRAIZ, T. L.; JAVID, A.; HUSSAIN, S.M.; SHAHBAZ, M.; DAUD, S. Microbial Analysis of Indian Flying Fox (*Pteropus giganteus*) Ejecta Collected from Two Public Parks in Lahore, Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 49, n. 1, 2017.
- HANDELAND, K.; REFSUM, T.; JOHANSEN, B. S.; HOLSTAD, G.; KNUTSEN, G.; SOLBERG, I.; SCHULZE, J.; KAPPERUD, G. Prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in Norwegian hedgehog populations associated with two human disease outbreaks. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 49, n. 1, p. 289-296, 2017.
- HART, J. A. Ruddy Ground Dove (*Columbina talpacoti*), version 1. In: Schulenberg, T. S. **Birds of the World**. Ithaca: Cornell Lab of Ornithology, 2020.
- HELD, J.; GMEINER, M.; MORDMÜLLER, B.; MATSIÉGUI, P.B.; SCHÄER, J.; ECKERLE, I.; WEBER, N.; MATUSCHEWSKI, K.; BLETZ, S.; SCHUMBURG, F. 2016. Bats are rare reservoir of *Staphylococcus aureus* complex in Gabon. Infect. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 47, p. 118-120, 2017
- HILBERT, F.; SMULDERS, F. J. M.; CHOPRA-DEWASTHALY, R.; PAULSEN, P. *Salmonella* in the wildlife-human interface. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 603-608, 2012.
- HICKS, C. L.; NAPIER, J. E.; ARMSTRONG, D. L.; GLADNEY, L. M.; TARR, C. L.; FREEMAN, M. M.; IWEN, P. C. Clonal spread of *Yersinia enterocolitica* 1B/O: 8 in multiple zoo species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 51, n. 1, p. 170-176, 2020.

- KRAUSHAAR, B.; DIECKMANN, R.; WITTWER, M.; KNABNER, D.; KONIETZNY, A.; MÄDE, D.; STRAUCH, E. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an *ail* gene. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 4, p. 997-1005, 2011.
- KRISMER, B.; WEIDENMAIER, C.; ZIPPERER, A.; PESCHEL, A. 2017. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. **Nature reviews microbiology**, v. 15, n. 11, p. 675-687, 2017.
- KUDIRKIENĖ, E.; MALAKAUSKAS, M.; MALAKAUSKAS, A.; BOJESEN, A. M.; OLSEN, J. E. Demonstration of persistent strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 3, p. 868-877, 2010.
- KUZMIN, I. V.; BOZICK, B.; GUAGLIARDO, S. A.; KUNKEL, R.; SHAK, J. R.; TONG, S.; RUPPRECHT, C. E. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. **Emerging health threats journal**, v. 4, n. 1, p. 7159, 2011.
- LOEFFLER, A.; BOAG, A. K.; LINDSAY, J. A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K. B.; LLOYD, D. H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 692-697, 2005.
- LUIS, A. D.; HAYMAN, D. T.; O'SHEA, T. J.; CRYAN, P. M.; GILBERT, A. T.; PULLIAM, J. R.; MILLS, M. E.; TIMONIN, C. K. R.; WILLIS, A. A.; CUNNINGHAM, A. R.; FOOKS, C. E.; RUPPRECHT, J. L. N.; COLLEEN, T. W. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1756, p. 20122753, 2013.
- MARIANA, N. S.; SALMAN, S. A.; NEELA, V.; ZAMBERI, S. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 6, p. 330-338, 2009.
- MILAN, C.; AGOSTINETTO, A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; GONZALEZ, H. L.; TIMM, C. D. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 642-646, 2015.
- 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, p. 1-27, 2016.
- MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1181–1187, 2008.

MÜHLDORFER, K.; WIBBELT, G.; HAENSEL, J.; RIEHM, J.; SPECK, S. *Yersinia* species isolated from bats, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 578, 2010.

MÜHLDORFER, K.; SPECK, S.; KURTH, A.; LESNIK, R.; FREULING, C.; MÜLLER, T.; KRAMER-SCHADT, S.; WIBBELT, G. 2011. Diseases and causes of death in European bats: dynamics in disease susceptibility and infection rates. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29773, 2011.

MÜHLDORFER, K. Bats and bacterial pathogens: a review. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 1, p. 93-103, 2013.

NEWMAN, M. M.; KLOEPPE, L. N.; DUNCAN, M.; MCINROY, J. A; KLOEPPE, J. W. Variation in bat guano bacterial community composition with depth. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. 914, p. 1-9, 2018.

NUNES, O. C.; OLIVEIRA, E. D.; LABORDA, S. S.; HOHLENWERGER, J. C.; NETO, M. M.; FRANKE, C. R. Isolamento e identificação de cepas de *Salmonella* spp. de jabutis-piranga oriundos do tráfico de animais silvestres. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 168-173, 2010.

NUNES, H.; ROCHA, F. L.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. **Urban ecosystems**, v. 20, n. 4, p. 953-969, 2017.

NURFS. **Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 25 jun 2016. Disponível em <<http://wp.ufpel.edu.br/nurfs/>>. Acesso em: 25 nov 2020.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; CÉ, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evaluation of selective and nonselective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 217–221, 2003.

PACHECO, S. M.; SODRÉ, M.; GAMA, A. R.; BREDT, A.; CAVALLINI, E. M.; MARQUES, R. V.; BIANCONI, G. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera neotropical**, v. 16, n. 1, p. 629-647, 2010.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil**. Occasional Papers in Conservation Biology nº 6. Conservation International: Arlington, 2012. 76p.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. D.; SILVA, C. A. D. S.; SOARES, N. D. F. F.; SILVA, E. A. M. D. Bacterial adherence to differentinert surfaces evaluated by

epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 47, n. 1, p. 77-83. 2004.

PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 6, p. 497-507, 2019.

PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N.; PACHECO, J. F.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; NAKA, L. N.; OLIMOS, 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.

Polícia Civil do Estado do Rio Grande do Sul. 2019. Operação Bad Hunters investiga crimes de caça ilegal de animais silvestres no norte gaúcho. Disponível em: <<https://www.pc.rs.gov.br/operacao-bad-hunters-investiga-crimes-de-caca-illegal-de-animais-silvestres-no-norte-gaucho>> Acesso em: 28 nov 2020.

PORRERO, M. C.; MENTABERRE, G.; SÁNCHEZ, S.; FERNÁNDEZ-LLARIO, P.; GÓMEZ-BARRERO, S.; NAVARRO-GONZALEZ, N.; SERRANO, E.; CASAS-DÍAZ, E.; MARCO, I.; FERNÁNDEZ-GARAYZABAL, J. F.; MATEOS, A.; VIDAL, D.; LAVÍN, S.; DOMÍNGUEZ, L. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 127-130, 2013.

PORRERO, M. C.; MENTABERRE, G.; SÁNCHEZ, S.; FERNÁNDEZ-LLARIO, P.; GÓMEZ-BARRERO, S.; NAVARRO-GONZALEZ, N.; SERRANO, E.; CASAS-DÍAZ, E.; MARCO, I.; FERNÁNDEZ-GARAYZABAL, J. F.; MATEOS, A.; VIDAL, D.; LAVÍN, S.; DOMÍNGUEZ, L. Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 16, p. 4865-4870, 2014.

RABSCH, W.; ANDREWS, H. L.; KINGSLEY, R. A.; PRAGER, R.; TSCHÄPE, H.; ADAMS, L. G.; BÄUMLER, A. J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. **Infection and immunity**, v. 70, n. 5, p. 2249-2255, 2002.

REYES, A. W. B.; ROVIRA, H. G.; MASANGKAY, J. S.; RAMIREZ, T. J.; YOSHIKAWA, Y.; BATICADOS, W. N. Polymerase chain reaction assay and conventional isolation of *Salmonella* spp. from Philippine bats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2011.

RUBINI, S.; RAVAIOLI, C.; PREVIATO, S.; D'INCAU, M.; TASSINARI, M.; GUIDI, E.; BERGAMINI, M. Prevalence of *Salmonella* strains in wild animals from a highly populated area of north-eastern Italy. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 52, n. 2, p. 277-280, 2016.

- SÁ, I. V. A. D.; SOLARI, C. A. *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n.4, p.293-297, 2001.
- SALGADO, C. D.; FARR, B. M.; CALFEE, D. P. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. 131-139, 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^oed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.
- SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765-769, 2010.
- SCHNEIDER, S.; CONTERATO, M. A.; KOPPE, L. R.; SILVA, C. D. A pluriatividade e as condições de vida dos agricultores familiares do Rio Grande do Sul. In: SCHNEIDER, S. **A diversidade da agricultura familiar**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. p. 137-164.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B. D.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. D. C. L.; DUTRA, R. A. F., LIMA FILHO, J. L. D. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.
- SILVEIRA, D. R.; MILAN, C.; FERRASSO, M. M.; DIAS, P. A.; de MORAES, T. P. M.; BANDARRA, P. M.; MINELLO, L. F.; TIMM, C. D. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* isoladas de animais silvestres em um centro de reabilitação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1838-1843, 2018.
- SKOV, R.; SMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A. R.; FRIMODT-MOLLER, N.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 204-207, 2003.
- SMYSER, C. F.; SNOEYENBOS, G. H. A pigeon host-adapted type of *Salmonella typhimurium* var. Copenhagen. **Avian diseases**, v.16, p. 270-277, 1972.
- SMYTH, D. S.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; FITZGERALD, J. R.; DEOBALD, C. F.; BOHACH, G. A.; SMYTH, C. J. Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 401-411, 2005.
- SÖDERLUND, R.; JERNBERG, C.; TRÖNNBERG, L.; PÄÄJÄRVI, A.; ÅGREN, E.; LAHTI, E. Linked seasonal outbreaks of *Salmonella* Typhimurium among

passerine birds, domestic cats and humans, Sweden, 2009 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 34, p. 1900074, 2019.

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.

TAVARES, V. C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A. L. A diversidade de morcegos no Brasil: lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. In: **Morcegos no Brasil: biologia, sistemática, ecologia e conservação**. Porto Alegre: Armazém Digital, 2008. p. 25-58

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN; P. A., MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.

TIMM, C. D.; DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; LIMA, H. G.; SILVEIRA, D. R. **Manual de técnicas microbiológicas em leite e derivados**. Pelotas: Ed. do autor, 2016, 88p.

TIMM C. D.; TIMM V. F. **Aves do extremo sul do Brasil: guia de identificação**. Pelotas: Useb, 2016. 334p.

TOMPKINS, D. M.; CARVER, S.; JONES, M. E.; KRKOŠEK, M.; SKERRATT, L. F. Emerging infectious diseases of wildlife: a critical perspective. **Trends in parasitology**, v. 31, n. 4, p. 149-159, 2015.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 28, n. 3, p. 397-403, 1985.

VAN LOO, I.; HUIJSDENS, X.; TIEMERSMA, E.; DE NEELING, A.; VAN DE SANDE-BRUINSMA, N.; BEAUJEAN, D.; KLUYTMANS, J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 12, p. 1834, 2007.

VANDZUROVA, A.; BACKOR. P.; JAVORSKY, P.; PRISTAS P. *Staphylococcus nepalensis* in the guano of bats (Mammalia). **Veterinary microbiology**, v. 164, n. 1-2, p. 116-121, 2013.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v. 5, n. 1, p. 25–40, 1994.

VOIGT, C. C.; PHELPS, K. L.; AGUIRRE, L. F.; SCHOEMAN, M. C.; VANITHARANI, J.; ZUBAID, A. Bats and buildings: the conservation of

synanthropic bats In: VOIGT, C. C.; PHELPS, K. L.; AGUIRRE, L. F.; SCHOEMAN, M. C.; VANITHARANI, J.; ZUBAID, A. *Bats in the Anthropocene: Conservation of bats in a changing world*. Springer, Cham, 2016. p. 427-462.

WALTHER, B.; WIELER, L. H.; FRIEDRICH, A. W.; HANSEN, A.; KOHN, B.; BRUNNBERG, L.; LÜBKEBECKER. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. **Veterinary microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 171-178, 2008.

WANNET, J. B. W.; REESSINK, M.; BRUNINGS, H. A. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive Duplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4483–4486, 2001.

WARDYN, S. E., KAUFFMAN, L. K., SMITH, T. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Iowa wildlife. **Journal of wildlife diseases**, v. 48, n. 4, p. 1069-1073, 2012.

WEAGANT, S. D.; FENG, P. *Yersinia enterocolitica*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (BAM), Chap. 8. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm072633.htm>>. Acesso em: 28 nov 2020.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, 2010.

WONG, L. F.; WALKER, P. J.; POON, L. L. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? **Current opinion in virology**, v. 1, n. 6, p. 649-657, 2011.

YABSLEY, M. J. The Role of Wildlife Rehabilitation in Wildlife Disease Research and Surveillance. **Medical Management of Wildlife Species: A Guide for Practitioners**, p. 159-165, 2019.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (23110.000978/2016-03)



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</i> , <i>Equus caballus</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Gaffus gallus</i> , <i>Ovis aries</i> , <i>Sicalis flaveola</i> , <i>Zenopsis capensis</i> , <i>Columba picui</i> , <i>Furnarius rufus</i> , <i>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 desse projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 0978-2016).

M.V. Drá. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável

Certifico: 27/4/2017

**Anexo II - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal
(23110.002640/2014-16)**



Pelotas, 14 de maio de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professor Cláudio Dias Timm

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Micro-organismos patogênicos isolados de animais silvestres recebidos em um núcleo de reabilitação**”, processo nº23110.002640/2014-16, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer e assiná-lo, reenviar o processo à CEEA. Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº **CEEA 2640-2014**).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 15/05/2014

Assinatura do Professor Responsável:

Anexo III – Autorização para atividades com finalidade científica (52270-3)



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: 52270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Reválidação*: 18/04/2019
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 reválidada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 360.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres: de propriedades plurais e comparação das perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Inicio (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Nova coleta de material	09/2019	12/2019
2	Aquisição de material	01/2019	03/2019
3	PCR para identificação das espécies bacterianas	06/2019	08/2019
4	Comparação das cepas por rtp-PCR	02/2019	10/2019
5	Coleta das amostras de fezes	03/2019	05/2019
6	Avaliação dos resultados e redação do manuscrito	08/2019	12/2019

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Thamires Pereira da Motta	Participante	019.792.250-11	Brasileira
2	Débora Rodrigues Silveira	Participante	077.109.889-00	Brasileira

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

Código de autenticação: 0522700320191008

Página 1/19



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: 52270-3	Data de Emissão: 08/10/2019 07:52:31	Data da Revalidação*: 18/04/2019
De acordo com o art. 38 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e propriedades pluriativas e comparação das perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Observações e ressalvas

I	A autorização não autoriza a pesquisador ou responsável de outras matérias ambientais, exceto II) da propriedade, arrendatário, posseiro ou menor quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro das fronteiras de conservação federal cuja presença de regulatória federal mencionada em acesse; III) da comunidade indígena, comunitária, assentamento, legião indigenista etc); quando as atividades de pesquisa forem realizadas em terra indígena; IV) do Conselho de Defesa Nacional; quando as atividades de pesquisa forem realizadas em área indigenizada à segurança nacional; V) da autoridade marítima; quando as atividades de pesquisa forem realizadas em águas portuárias brasileiras; VI) da delegia geral de controle de conservação estadual, municipal ou municipal, dentro suas.
II	O uso de pesquisas em UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, a pesquisador maior deles, autorização deve ser emitida a autorização da unidade a fim de COMPROMETER AS DATAS das pesquisas, as condições para realização das atividades e o uso da infraestrutura da unidade.
III	O uso de autorização na de licença permanentemente, assim como os membros da sua equipe, quando a legislação da legislação vigente, ou quando da instalação, comitê ou laudo de licenças de instalações referentes suas subordinadas a expedição da alic, poderá, mediante decisão escrita, ter a autorização na licença suspenso ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
IV	O uso documento comprovante poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, ou que expõe na Autonomia, não poderão ser utilizados para fins complementar, substituir ou respostas. O material biológico obtido deve ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito de ensino superior.
V	As atividades são sempre autorizadas para pesquisas naturais na justiça ambiental, em busca a fronteira nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, bem como apropriar terras, materiais, equipamentos biológicos e materiais, grupos integrantes da cultura nativa e culturas populares, presente e passada, obtidos por meio de recursos e literatura que se deslocam ao exterior, à difusão da pesquisa, estão sujeitas a autorização de Ministério de Ciência e Tecnologia.
VI	O uso de licença ou autorização e os membros da sua equipe devem optar por estudos de cestas e instrumentos de coleta de espécies silvestres, sempre que possível, os grupos comunitários de interesse, evitando a morte ou danos significativos a outros grupos, e empregar estudos de cestas ou captura que estejam comprometendo a constituição de populações de grupos comunitários de interesse em condições de uso.
VII	Uma autorização NÃO autoriza o pesquisador maior e os membros da sua equipe da responsabilidade de ceder as amostras produzidas em outras instalações legais, bem como da conservação da responsabilidade pela área, público ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive da delegia geral de terra indígena (DGTI), das unidades de conservação estadual, municipal ou municipal, ou de proprietário, arrendatário, posseiro ou menor de áreas dentro das fronteiras de conservação federal cuja presença de regulatória federal mencionada em acesse.
VIII	Uma observação não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente da biodiversidade existente no território nacional, na plataforma continental e nas águas internacionais, ou no território continental associado ao problema genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja outras informações em nota essa publicação.

Outras ressalvas

1	As reuniões de trabalho, devem ser certificadas no mínimo de 30 em 30 minutos. As armadilhas utilizadas para a coleta devem ser visibilizadas pelo menos duas vezes ao dia (uma manhã e tarde) para minimizar a morte devido a fome ou hipotermia.	COPICO
---	--	--------

Este documento 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: 0522700320191008

Página 2/19

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 02270-3	Data da Emissão: 08/03/2019 07:52:31	Data da Revogação*: 18/04/2019
De acordo com o art. 20 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revogada 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: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres de propriedades plurais e comparação das perdas moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.342.080/0001-00

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverno?	Tipo
1	Propriedades rurais	Pedro Oscar-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
2	Propriedades rurais	Turvo-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
3	Propriedades rurais	Pelotas-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
4	Propriedades rurais	Rio Grande-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
5	Propriedades rurais	Morro Redondo-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
6	Propriedades rurais	Capão do Leito-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
7	Propriedades rurais	Canguçu-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
8	Propriedades rurais	Cerro-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
9	Propriedades rurais	São Lourenço do Sul-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal
10	Propriedades rurais	Amoia do Padre-RS	Pampa	Não	Foto da UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Foto da UC Federal
2	Marcação de animais silvestres in situ	Foto da UC Federal

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxon	Qtd.
1	Marcação de animais silvestres in situ	Akodon montensis	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Akodon montensis	-
3	Marcação de animais silvestres in situ	Poospiza cabanisi	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Poospiza cabanisi	-
5	Marcação de animais silvestres in situ	Euphonia chlorotica	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Euphonia chlorotica	-
7	Marcação de animais silvestres in situ	Polioptila dumicola	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Polioptila dumicola	-
9	Marcação de animais silvestres in situ	Pygochelidon cyanoleuca	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Pygochelidon cyanoleuca	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	Chrysomus ruficapillus	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chrysomus ruficapillus	-
13	Marcação de animais silvestres in situ	Schoeniophylax phryganophilus	-

Este documento 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).



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: 62270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Reválidação*: 18/04/2019
De acordo com o art. 20 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser reválidada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CNPJ: 300.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e propriedades plurissimais e comparação dos perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Atividades X Táxon

#	Atividade	Táxon	Qtde.
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Schoenophylax phryganophilus</i>	-
15	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Poeciloticus plumbeiceps</i>	-
16	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Poeciloticus plumbeiceps</i>	-
17	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Agelaius tridactylus</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Agelaius tridactylus</i>	-
19	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Cyanoloxia glauccosericea</i>	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Cyanoloxia glauccosericea</i>	-
21	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Fregata spreta</i>	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Fregata spreta</i>	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Julomyia pictipes</i>	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Julomyia pictipes</i>	-
25	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Delanyia kempfi</i>	-
26	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Delanyia kempfi</i>	-
27	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Brucapartamensis herringi</i>	-
28	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Brucapartamensis herringi</i>	-
29	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Serpophaga griseicapilla</i>	-
30	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Serpophaga griseicapilla</i>	-
31	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Pipreola bonariensis</i>	-
32	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pipreola bonariensis</i>	-
33	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Lanius cucullatus</i>	-
34	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Lanius cucullatus</i>	-
35	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Icterus pyrrhotaeus</i>	-
36	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Icterus pyrrhotaeus</i>	-
37	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Spongia magellonica</i>	-
38	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Spongia magellonica</i>	-
39	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Cyanoloxia brasiliensis</i>	-
40	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Cyanoloxia brasiliensis</i>	-
41	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Mus musculus</i>	-
42	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Mus musculus</i>	-
43	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Machetornis rixosa</i>	-
44	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Machetornis rixosa</i>	-
45	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Agelaiodes bedius</i>	-
46	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Agelaiodes bedius</i>	-

Este documento 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: 622700320191808

Página 4/19

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 05227003	Data de Emissão: 08/10/2019 07:32:21	Data de Reválidação*: 18/04/2019
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 reválidada 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: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres: de propriedades plurivias e comparação das perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.242.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Okada
47	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Hymenaea paniculata</i>	-
48	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Hymenaea paniculata</i>	-
49	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Sturnella superciliosa</i>	-
50	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sturnella superciliosa</i>	-
51	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Oxymyces nasutus</i>	-
52	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Oxymyces nasutus</i>	-
53	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	-
54	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	-
55	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Calomys laucha</i>	-
56	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Calomys laucha</i>	-
57	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Alectroenas australis</i>	-
58	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Alectroenas australis</i>	-
59	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Passer domesticus</i>	-
60	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Passer domesticus</i>	-
61	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Panurus coronatus</i>	-
62	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Panurus coronatus</i>	-
63	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Cacicus chrysopterus</i>	-
64	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Cacicus chrysopterus</i>	-
65	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Basiliscus basiliscus</i>	-
66	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Basiliscus basiliscus</i>	-
67	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Basiliscus basiliscus</i>	-
68	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Basiliscus basiliscus</i>	-
69	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Anundinicola leucoccephala</i>	-
70	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Anundinicola leucoccephala</i>	-
71	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Anumbius annumbi</i>	-
72	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Anumbius annumbi</i>	-
73	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Ammodytes humeralis</i>	-
74	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Ammodytes humeralis</i>	-
75	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Amblyomphalus holcocephalus</i>	-
76	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Amblyomphalus holcocephalus</i>	-
77	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Tangara preciosa</i>	-
78	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Tangara preciosa</i>	-
79	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Mimus saturninus</i>	-

Este documento 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: 0522700320191008

Página 5/19

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 02270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Revogação*: 18/04/2019
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 revogada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dau Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres da propriedade plurais e comparação dos perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Atividades X Táxona

#	Atividade	Táxon	Ótico.
00	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Mimus saturninus</i>	-
01	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Mimus triurus</i>	-
02	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Mimus triurus</i>	-
03	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Lochmaea nematura</i>	-
04	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Lochmaea nematura</i>	-
05	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Limnonia curvirostra</i>	-
06	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Limnonia curvirostra</i>	-
07	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Laniocera rufa</i>	-
08	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Laniocera rufa</i>	-
09	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Leptotila verreauxi</i>	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Leptotila verreauxi</i>	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Lathrotriccus euleri</i>	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Lathrotriccus euleri</i>	-
13	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Kriolegus lophotes</i>	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Kriolegus lophotes</i>	-
15	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Kriolegus cyanopterus</i>	-
16	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Kriolegus cyanopterus</i>	-
17	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Graira guira</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Graira guira</i>	-
19	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Gnomopsar chopi</i>	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Gnomopsar chopi</i>	-
21	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Geothlypis squinocephala</i>	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Geothlypis squinocephala</i>	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Gecatita cunicularia</i>	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Gecatita cunicularia</i>	-
25	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Euphonia cyanocephala</i>	-

Este documento 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).



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 03270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Revalidação*: 18/04/2019
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: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e propriedades plurais e comparação das perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.242.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Euphonia cyanocephala</i>	-
10	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Euphonia chalybea</i>	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Euphonia chalybea</i>	-
10	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Empidonax variegatus</i>	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Empidonax variegatus</i>	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Emberiza platerae</i>	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Emberiza platerae</i>	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Emberizoides herbicola</i>	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Emberizoides herbicola</i>	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Elaenia parvirostris</i>	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Elaenia parvirostris</i>	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Elaenia flavogaster</i>	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Elaenia flavogaster</i>	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Elaenia macroura</i>	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Elaenia macroura</i>	-
12	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Elaenia obscura</i>	-

Este documento 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: 0522700320191008

Página 7/19



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 052270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Revalidação*: 18/04/2019
De acordo com o art. 38 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e avaliação das propriedades plurais e comparação das perdas moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.342.000/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Ocas.
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Elaenia obsoleta</i>	-
2			
12	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Donacobius albifrons</i>	-
3			
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Donacobius albifrons</i>	-
4			
12	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Cyclarhis gujanensis</i>	-
5			
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Cyclarhis gujanensis</i>	-
6			
13	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Crotophaga ani</i>	-
7			
12	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Crotophaga ani</i>	-
8			
12	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	-
9			
13	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	-
0			
13	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Crotophaga sulphurata</i>	-
1			
13	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Crotophaga sulphurata</i>	-
2			
13	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Crotophaga pyrrhocorax</i>	-
3			
13	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Crotophaga pyrrhocorax</i>	-
4			
13	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Columba picui</i>	-
5			
13	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Columba picui</i>	-
6			
13	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Columba talpacoti</i>	-
7			

Este documento 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).

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 02270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Reválidação*: 18/04/2019
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 reválidada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Claudio Dias Timm	CPF: 300.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres da propriedades plurais e comparação dos perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Okta.
13	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Columbina talpacoti</i>	-
13	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Colaptes campestris</i>	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Colaptes campestris</i>	-
14	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Colaptes melanochloros</i>	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Colaptes melanochloros</i>	-
14	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Cinclodes fuscus</i>	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Cinclodes fuscus</i>	-
14	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Certhiaxis cinnamomea</i>	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Certhiaxis cinnamomea</i>	-
14	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Troglodytes musculus</i>	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Troglodytes musculus</i>	-
14	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Tolmomyias sulphureocinctus</i>	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Tolmomyias sulphureocinctus</i>	-
15	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Todirostrum plumbeiceps</i>	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Todirostrum plumbeiceps</i>	-
15	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Tachyphonus coronatus</i>	-

Este documento 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).

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 02270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Reválidação*: 18/04/2019
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 reválidada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Claudio Dias Timm	CPF: 303.622.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e propriedades plurativas e comparação das perfiles moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.242.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Onde:
15 4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Tachyporus coronatus	-
15 5	Marcação de animais silvestres in situ	Tachycineta leucopyga	-
15 6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Tachycineta leucopyga	-
15 7	Marcação de animais silvestres in situ	Tachycineta leucopyga	-
15 8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Tachycineta leucopyga	-
15 9	Marcação de animais silvestres in situ	Tachuris rubrigaster	-
16 0	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Tachuris rubrigaster	-
16 1	Marcação de animais silvestres in situ	Syndaciyla nelsonsuperclata	-
16 2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Syndaciyla nelsonsuperclata	-
16 3	Marcação de animais silvestres in situ	Synallaxis frontalis	-
16 4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Synallaxis frontalis	-
16 5	Marcação de animais silvestres in situ	Synallaxis cinerea	-
16 6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Synallaxis cinerea	-
16 7	Marcação de animais silvestres in situ	Synallaxis spixi	-
16 8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Synallaxis spixi	-
16 9	Marcação de animais silvestres in situ	Stephanophorus diadematus	-

Este documento 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: 0522700320191008

Página 10/19

Autorização para atividades com finalidade científica

Número:	Data da Emissão:	Data da Revalidação*:
52270-3	08/10/2019 07:52:21	18/04/2019

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 da sua emissão.

Dados do Titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e aves e avaliação de propriedades plurivias e comparação dos perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.242.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
17 0	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Stephanophorus diadematus</i>	-
17 1	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Sialidopteryx ruficollis</i>	-
17 2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sialidopteryx ruficollis</i>	-
17 3	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Sporophila collaris</i>	-
17 4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sporophila collaris</i>	-
17 5	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Sporophila caerulescens</i>	-
17 6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sporophila caerulescens</i>	-
17 7	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Sicalis flaveola</i>	-
17 8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sicalis flaveola</i>	-
17 9	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Sicalis luteola</i>	-
18 0	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sicalis luteola</i>	-
18 1	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Serpophaga subcristata</i>	-
18 2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Serpophaga subcristata</i>	-
18 3	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Serpophaga nigricans</i>	-
18 4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Serpophaga nigricans</i>	-
18 5	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Serpophaga munda</i>	-

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 0522700320191000	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Reválidação*: 18/04/2019
De acordo com o art. 2º da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser reválidada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres: da propriedades plurativas e comparação das perdas moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.342.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Serpophaga munda</i>	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Sclerurus scanor</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sclerurus scanor</i>	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Satrapa icterophrys</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Satrapa icterophrys</i>	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Saltator similis</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Saltator similis</i>	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Saltator aurantirostris</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Saltator aurantirostris</i>	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Pycnonotus rubiginosus</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pycnonotus rubiginosus</i>	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Pseudoleistes virens</i>	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pseudoleistes virens</i>	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Pseudoleistes guinehoro</i>	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pseudoleistes guinehoro</i>	-
20	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Pseudocolopteryx sclateri</i>	-

Este documento 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).



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 0522700320191008	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Reválidação*: 18/04/2019
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 reválidada 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: 363.622.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres: da propriedades plurais a comparação das perfis moleculares dos isolados		
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas		CNPJ: 92.242.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pseudocolopteryx acutipennis</i>	-
21	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Pseudocolopteryx flaviventris</i>	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pseudocolopteryx flaviventris</i>	-
20	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Progne chalybea</i>	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Progne chalybea</i>	-
20	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Poospiza nigromata</i>	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Poospiza nigromata</i>	-
20	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Pitangus sulphuratus</i>	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pitangus sulphuratus</i>	-
21	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Pipreoloides melanocephala</i>	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pipreoloides melanocephala</i>	-
21	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Picumnus nebulosus</i>	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Picumnus nebulosus</i>	-
21	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Phylloscartes ventralis</i>	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Phylloscartes ventralis</i>	-
21	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Phlegopsis melanops</i>	-

Este documento 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).



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 03270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:31	Data da Reválidação*: 18/04/2019
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 reválidada 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 da aniversário da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres: de propriedades plurivias e comparação das perdas moleculares dos isolados	
Nome do Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.342.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
21	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Phaeocystis melanope</i>	-
21	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Phacelodromus atricollis</i>	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Phacelodromus atricollis</i>	-
22	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Panula pitayum</i>	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Panula pitayum</i>	-
22	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Pachynamphus virens</i>	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pachynamphus virens</i>	-
22	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Pachynamphus polychopterus</i>	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Pachynamphus polychopterus</i>	-
22	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Myrophobus fasciatus</i>	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Myrophobus fasciatus</i>	-
22	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Myodynamus maculatus</i>	-
23	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Myodynamus maculatus</i>	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Myarchus evansi</i>	-
23	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Myarchus evansi</i>	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	-

Este documento 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).



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 05227003201910008	Data de Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Revalidação*: 18/04/2019
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: Claudio Dias Timm	CPF: 300.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e propriedades plurais e comparação das perfilas moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Atividades X Táxona

#	Atividade	Táxon	Cida.
23	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Molothrus bonariensis</i>	-
23	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Molothrus bonariensis</i>	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Zenopsis capensis</i>	-
23	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Zenopsis capensis</i>	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Zenaidura auriculata</i>	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Zenaidura auriculata</i>	-
24	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Xolmis irupero</i>	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Xolmis irupero</i>	-
24	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Volatinia jacarina</i>	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Volatinia jacarina</i>	-
24	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Vireo chivi</i>	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Vireo chivi</i>	-
24	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Verdinula spilogaster</i>	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Verdinula spilogaster</i>	-
24	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Tyrannus savana</i>	-

Este documento 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).



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 052270-3	Data da Emissão: 06/03/2019 07:52:21	Data da Revalidação*: 18/04/2019
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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres: da propriedades plurais e comparação dos perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 82.242.089/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Tyrannus savana</i>	-
0			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Tyrannus melancholicus</i>	-
1			
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Tyrannus melancholicus</i>	-
2			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Turdus philomelos</i>	-
3			
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Turdus philomelos</i>	-
4			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Turdus albicollis</i>	-
5			
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Turdus albicollis</i>	-
6			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Turdus amaurochalinus</i>	-
7			
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Turdus amaurochalinus</i>	-
8			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Cavia</i>	-
9			
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Cavia</i>	-
0			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Rattus rattus</i>	-
1			
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Rattus rattus</i>	-
2			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Scapteromys humidus</i>	-
3			
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Scapteromys humidus</i>	-
4			
25	Marcágio de animais silvestres in situ	<i>Dolomys donalis</i>	-
5			

Este documento 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).

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 052270-3	Data da Emissão: 06/10/2019 07:52:31	Data da Reválidação*: 18/04/2019
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 reválidada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e avaliação de propriedades plurais e comparação das perto moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.242.080/0001-00

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Ótico:
28	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Dolomys donacina</i>	-
26	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Estrilda astrild</i>	-
28	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Estrilda astrild</i>	-
26	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Camptostoma obsoletum</i>	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Camptostoma obsoletum</i>	-
27	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Allochelidon fucata</i>	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Allochelidon fucata</i>	-
27	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Mirundo rusticus</i>	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Mirundo rusticus</i>	-
27	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Coereba flaveola</i>	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Coereba flaveola</i>	-
27	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Phaethornis fernandensis</i>	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Phaethornis fernandensis</i>	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Feces
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Feces
3	Método de captura/colata (Aves)	Ração de milho

Este documento 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).



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: 052270-3	Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21	Data da Reválidação*: 18/04/2019
De acordo com o art. 3º da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser reválidada 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Dass Timm	CPF: 300.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres e propriedades plurais e comparação das perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
4	Método de captação/colheita (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atrapão por iscas (Box Trap/Tomahawk/Sherman.)
5	Método de marcação (Outros mamíferos)	Outros métodos de marcação (corante de pele)

Destino do material biológico coletado:

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal de Pelotas	Outro

Este documento 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: 0522700320191008

Página 18/19



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52270-3 | Data da Emissão: 08/10/2019 07:52:21 | Data da Revalidação*: 18/04/2019

De acordo com o art. 38 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 da Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário da sua emissão.

Dados de Mular

Nome: Cláudio Dias Timm	CPF: 303.022.340-04
Título do Projeto: Isolamento de bactérias patogênicas de animais domésticos e silvestres da propriedade plurais e comparação das perfis moleculares dos isolados	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 02.242.080/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, 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).

*** Identificar e auxiliar o nível taxonómico possível.**

Este documento 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: 0522700320191003

Anexo IV – Licença permanente para material zoológico (52646-1)



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 52646-1	Data da Emissão: 18/02/2016 15:02
Dados do titular	
Nome: Ana Maria Rui	CPF: 603.243.760-49
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Observações e ressalvas

1	A licença de campo exercida por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que empreguem o descobrimento de recursos hídricos e materiais, sendo por objetos colecionários, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, coletados por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorizações do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) introdução de espécies de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituidas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Enté licença permanente NAO autoriza o pesquisador titular da licença permanente a obter as autorizações previstas em outras normativas legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do dirigente gestor da terra indígena (Funai), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Enté licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, indústria ou exploração ou para realização de atividades integrantes do processo de funcionamento ambiental das organizações.
6	Enté documento NAO autoriza o pesquisador titular da licença permanente de abeter ou dispensar a disposição na Instrução Normativa Reta nº 3/2003, que regulamenta o Sistema Nacional de Atribuição de Áreas Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O dirigente gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a depender da licença permanente e das autorizações concedidas pelo MMA, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular da licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captação direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captação que não comprometa a viabilidade da população do grupo taxonômico de interesse em condições <i>in situ</i> .
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o encerramento da emissão da licença permanente.
11	O titular da autorização ou de licença permanente, assim como os titulares de autorizações, quando da realização de legislação vegetal ou quando da desapropriação, comissão ou faixa descolada de informações relevantes que subsistem a expedição do uso, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente não sólida enquanto durar o vínculo entre o pesquisador com a instituição científica a qual ele estiver vinculado por ocasião da licenciatura.
13	Enté documento não dispensa o cumprimento das legislações que dispõem 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, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/biotec .

Táxons autorizados

Nº	Nível Taxonómico	Taxa(s)
1	04805.M	Chiroptera
2		

Destino do material biológico coletado

Nº	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	Coleta

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) 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: 62261942



Página 1/2



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 52046-1	Data de Emissão: 18/03/2016 15:02
Dados do titular	
Nome: Ana Maria Rui	CPF: 603.343.760-49
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).

What are some real incentives people

SISBIO
Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação aberto, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regulamentação deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 62261942

