



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO  
DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Débora de Oliveira Losnak**

**Detecção molecular de fungos importantes em saúde  
pública em animais silvestres mortos por atropelamento no  
estado de Santa Catarina, Brasil.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra Virginia Bodelão Richini Pereira

**Botucatu  
2017**

Débora de Oliveira Losnak

**Detecção molecular de fungos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Losnak, Debora de Oliveira.

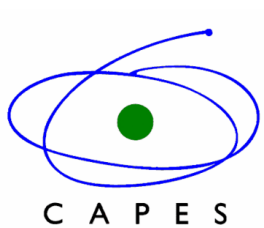
Detecção molecular de fungos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil / Debora de Oliveira Losnak. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira  
Capes: 21300003

1. Animais silvestres. 2. Fungos patogênicos. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Paracoccidioides brasiliensis. 5. Saúde pública.

Palavras-chave: Cryptococcus spp.; Fungos patogênicos; Histoplasma capsulatum; PCR; Paracoccidioides brasiliensis.

Auxílio financeiro



Bolsa Demanda Social



Processo nº 2015/17519-4

# *Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais, que com muito suor,  
batalharam para eu chegar até aqui, com noites mal  
dormidas, almoços mal almoçados e pedrinhas nas  
malas de roupa.*

# *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu meu dom maior: minha Vida  
Por Ele ter me amparado nos momentos de choro e angústia de uma pós-graduanda  
prestes a se casar e a defender esta dissertação, por ter atendido a muitos dos  
meus pedidos.

A Ele todo Louvor e Glória.

Aos meus pais, Carlos e Celene, que desde meu nascimento me apoiam em todas  
as minhas decisões, me ajudando com palavras, muitas broncas e ajuda financeira  
(claro), sem essas “coisas” não conseguiria chegar até aqui, por isso esse título  
também pertence a vocês, papis e mamis, que além de pais, são meu Porto Seguro.  
Meu muito obrigada e um eu te amo com muitos beijos na testa, queixo, bochechas  
e ponta do nariz.

Ao meu irmão, vulgo “mãсно”, Denis, um quase cientista social que me ajuda  
sempre em todas as decisões que vou tomar, que sempre briga comigo, que me  
escutou várias vezes reclamar de tudo, deu seu ombro para eu chorar todas as  
vezes que eu precisava e me xinga sempre que estou fazendo algo errado.

Obrigada por todos os momentos juntos de risada e de amor.

I love u bebê.

Aos meus avós maternos, Celso e Celina, e aos avós paternos, Hércio e Cacilda, por  
todas as palavras de apoio, por toda a sabedoria de pessoas “antigas” (como vocês  
falam), sem essas sabedorias que só gente bem vivida tem, eu não teria aberto  
meus olhos para muitas coisas. Obrigada por existirem e me amarem.

Todos os meus familiares, tios, tias, primos, primas, que são muitas pessoas para nomear, agradeço por se preocuparem comigo, me dar suporte e entender todas as “saídas”, café da tarde e almoços que não fui porque eu estava escrevendo.

Agora posso fazer tudo.

Um agradecimento super especial ao meu marido Renan. Pra você todo o meu amor e meu muito obrigada, porque sei que não foi fácil me aguentar até aqui, uma noiva estressada, pós-graduanda com prazos e que muitas vezes te deixei de lado pra focar na dissertação. Obrigada por todos os pastéis e chocolates no momento de estresse. Obrigada por estar ao meu lado me amando e escutando sobre PCRs e fungos.

Meu amor para toda a vida, te amo.

Obrigada também a minha nova família, minha sogra Regina por ter me dado meu maior presente e por sempre me auxiliar em decisões com suas palavras, minha cunhada Rafaela que é minha irmã que amo muito, ao meu “sograsto” Antônio Carlos (Polaco) e a todos os outros familiares novos, por me entender e me apoiar sempre.

Ao avô Tônico por me animar com suas histórias e sua vivência. Me inspiro no senhor e quero chegar aos 90 anos com a saúde que tem para fazer “física”.

Agradeço ao meu sogro Claudiomar *-in memoriam-* não cheguei a conhecê-lo, mas sei que muitas coisas de você, vive em seu filho. Você o criou muito bem e o transformou em um homem maravilhoso. Acredito que se estivesse aqui, seríamos

grandes amigos.  
Obrigada por sua missão.

Para a minha avó Durvalina - *in memoriam* - obrigada pelos ensinamentos deixados e por todas as vezes que pegou em minha mão e fez minhas ansiedades sanarem com seu toque macio. Saudades eternas.

*"Quana quer dizer família. Família quer dizer nunca abandonar ou esquecer."*  
*Lilo e Stich*

Aos meus amigos da igreja, faculdade, escola e de infância, obrigada por risadas, choros, brincadeiras, filmes e saídas para comer, pois foi com a amizade de vocês que me tornei o que sou hoje.

Agradeço a todos da Creche da Virgínia, por momentos e aprendizados compartilhados. Ket, Lívia Ramos e Laís, por todas as palavras e conversas, mesmo

nas mais simples das conversas, me ajudaram e me aconselharam.

Ao Wesley/Lívia que são tratados quase como um só, mas a Lívia é minha Xêmea e o Wesley meu amigo nerd. Agradeço aos dois por me ouvirem várias vezes no desespero e na alegria, com textões intermináveis no WhatsApp e sempre prontos pra me ajudarem e dar várias dicas pra vida e pra dissertação.

Amo vocês s2

Às Lutzetes maravilindas:

Natássia, o que dizer de você que chegou há pouco tempo mas já considero “pacas”? Deixando o Orkut de lado, obrigada por me fazer rir, por ser doida igual todas nós e desculpa por ter que tirar a atenção da Virgínia de você (hahaha);

Ághata minha parceira de caronas e amostras, obrigada por conselhos dados, por me animar nas horas que eu estava desanimada, por me ouvir e me ajudar sempre;

Barbara minha irmã de lab, são quase quatro anos me aguentando, me ajudando, me ouvindo, me inspirando, tendo paciência e sempre do meu lado;

E desculpa girls, mas não posso deixar de fazer um agradecimento especial a minha pupila Fran, que me ajudou muito extraindo DNA de incontáveis amostras de órgãos e fazendo inúmeras PCR, obrigada por tudo minha parceira.

Amo todas vocês Lutzetes.

Laís Acre e/ou Laís Campinas, obrigada por todos os papos de PCR, animais silvestres, igreja, Harry Potter, cãesíneos e tudo mais. Amo conversar com você, comer Bib’Sfiha ou qualquer outra comida. Obrigada por toda companhia e ajuda.

Cássio, obrigada por dividir momentos maravilhosos no lab e no dia a dia fora do Lutz, por conversas, brigas por marmitas ou coisas fúteis, por toda a sua sinceridade e apoio, te amo e sinto saudades de você no lab pra brigar e me amar (hahaha).

Meu agradecimento especial vai para a minha querida Boss, minha orientadora que teve muita paciência comigo, pra me aguentar nesses anos, com minhas confusões de contas, meus atrasos na entrega de escrita e apresentações, obrigada por não ser só minha orientadora, mas minha amiga e uma mãe pra mim. Obrigada por tudo, se cheguei aqui foi por seus puxões de orelha e por eu me inspirar em você, pois quero ser igual você quando eu crescer. <3

*“Quem cedo e bem aprende, tarde ou nunca esquece. Quem negligencia as manifestações de amizade, acaba por perder esse sentimento.” William Shakespeare*

*“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de formar grandes sofrimentos e também de remediá-los.”*

*Alvo Dumbledore*

*Resumo*

## Resumo

LOSNAK. DO. **Detecção molecular de fungos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.** 2017. 85p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

A emergência e reemergência de doenças infecciosas é impulsionada por vários fatores e a busca de patógenos em amostras animais podem oferecer oportunidades para estudos eco-epidemiológicos e também dados sobre a evolução dos patógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de fungos patogênicos importantes em saúde pública, em exemplares de animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina e identificar e mapear áreas de risco para a infecção humana. Grande parte destes fungos apresenta em comum dimorfismo, distribuição geográfica restrita e produção de conídios infectantes que são aspirados pelo hospedeiro por meio das vias respiratórias. Cães e tatus são apontados como transmissores de *Paracoccidioides brasiliensis*, os morcegos ao *Histoplasma* spp., assim como as fezes de pombos ao *Cryptococcus* spp.. No presente trabalho foram analisadas 1063 amostras de pulmão, fígado, baço, pele e coração de 297 animais silvestres, para detecção de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus* spp. pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Utilizou-se *primers* universais para detecção de fungos em geral e obteve-se positividade em 102 amostras de 59 animais. Para a análise de *P. brasiliensis*, utilizou-se os *primers* específicos, obtendo oito amostras positivas em cinco animais (quatro *Oxymycterus* spp. e um *Euryoryzomys russatus*). Não houve a detecção molecular para *Histoplasma* spp.. Foi possível a identificação de três amostras para *Cryptococcus* spp.. O sequenciamento foi realizado, porém em 89 amostras de 49 animais foi possível somente a identificação em *Fungal* sp. (GenBank KT923226.1), duas amostras para *Cryptococcus neoformans* (GenBank KY107218.1) obtidas de *Oxymycterus* spp. e *Akodon* spp. e três amostras de *Aspergillus penicillioides* (GenBank KP131612.1 e KP997215.1) obtidas de *Gracilinanus* spp., *Oxymycterus* spp. e *Philander* spp. Importante salientar que houve coinfeção de *P. brasiliensis* e *Cryptococcus neoformans* em amostra de um *Oxymycterus* spp. Esta pesquisa mostra a importância dos animais silvestres na transmissão de doenças e auxilia no mapeamento dos locais de ocorrência de determinados patógenos e doenças em uma região ainda não avaliada.

**Palavras-Chave:** Fungos patogênicos, PCR, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp., *Aspergillus penicillioides*

## Abstract

LOSNAK. DO. **Molecular detection of important fungi for public health in road-killed wild animals in Santa Catarina State**, Brasil 2017. 85p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

The emergence and reemergence of infectious diseases is propelled by many diverse factors and the search for pathogens in animal samples may offer opportunity for eco-epidemiologic studies as well as data on the evolution of pathogens. The objective of this study was to evaluate in samples of road-killed wild animals the occurrence of pathogenic fungi of importance for public health. A great part of these fungi presented, in common, dimorphism, restricted geographic distribution and production of conidia infecting, which are aspirated by the host by means of their respiratory tract. Dogs and armadillos are normally related to the transmission of *Paracoccidioides brasiliensis*, bats to *Histoplasma* spp., as well as pigeons feces to *Cryptococcus* spp.. In this study we analyzed 1063 samples of organs of 297 wild animals for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus* spp. by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). Universal primers were employed for the detection of fungi in general and positivity was obtained in 102 samples from 59 animals. For the *P. brasiliensis* analysis was used specific primers, resulting in eight positive samples from five animals (four *Oxymycterus* spp. and one *Euryoryzomys russatus*). There was no molecular detection to *Histoplasma* spp.. Was possible the identification of three samples to *Cryptococcus* spp.. The sequencing was performed, however in 89 samples from 49 animals was possible to identify *Fungal* sp. (GenBank KT923226.1), two samples for *Cryptococcus neoformans* (GenBank KY107218.1) obtained from *Oxymycterus* spp. and *Akodon* spp. and three samples from *Gracilinanus* spp., *Oxymycterus* spp. and *Philander* spp. were positive for *Aspergillus penicillioides* (GenBank KP131612.1 e KP997215.1). Is important emphasize the coinfection with *P. brasiliensis* and *Cryptococcus neoformans* in a sample from *Oxymycterus* spp.. This research shows the importance of the wild animals in transmissions of diseases and assists in the mapping of pathogen and disease sites in a region that has not yet been evaluated.

**Key words:** Pathogenic fungi, PCR, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp., *Aspergillus penicillioides*

## Sumário

<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>16</b>
<b>Revisão da literatura .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>25</b>
<b>Referências .....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>44</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>70</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>71</b>

# *Capítulo 1*

## 1 **Revisão da literatura**

2 A intervenção humana e os fenômenos naturais causam desordens no ambiente e são  
3 considerados fatores importantes nas emergências e reemergências de doenças (Bengis et al.,  
4 2004; Keesing et al., 2010). A transmissão de agentes infecciosos também é facilitada devido  
5 ao crescimento populacional, à introdução dos animais a novos habitats ou a falta deles,  
6 alterações na distribuição dos hospedeiros e vetores (Jones et al., 2008; Thompson et al.,  
7 2009). O aumento da interação da vida silvestre com humanos e animais domésticos também  
8 contribui para a transmissão de zoonoses (Smith-Patten & Patten, 2008; Laurance et al., 2009;  
9 Preston et al., 2013).

10 Zoonoses, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são as doenças e/ou  
11 infecções comuns entre animais e homens, cuja transmissão possa ocorrer de um para o outro.  
12 São transmitidas de maneira direta ou indireta. O contato com excreções ou secreções de  
13 animais infectados é considerado como transmissão direta. Por outro lado, quando a  
14 transmissão ocorre por água ou alimentos contaminados, como também por insetos vetores ou  
15 moluscos, essa transmissão é indireta (Acha & Szyfres, 1986).

16 Para as aplicações práticas relacionadas com a prevenção, vigilância e detecção de  
17 doenças em animais (incluindo as zoonoses), vêm sendo utilizado o conceito *One Health*  
18 (saúde única) que consiste no esforço colaborativo de várias áreas para alcançar a saúde das  
19 pessoas, ambiente, animais domésticos e animais silvestres (Bidaisee & Macpherson, 2014;  
20 Gebreyes et al., 2014; Jenkins et al., 2015).

21 Os estudos epidemiológicos utilizando animais silvestres são restritos, pois muitas  
22 espécies já estão em risco de extinção, assim, uma alternativa em pesquisa para o  
23 esclarecimento da epidemiologia de doenças de interesse em saúde pública é o uso de animais  
24 silvestres mortos por atropelamento. As estradas e rodovias possibilitam unir cidades e  
25 estados com o objetivo de facilitar a passagem de veículos, porém passam por habitats

26 naturais e em locais próximos, dentro e fora de centros de conservação, dificultando a  
27 migração rotineira de animais, ou quando estes estão à procura de abrigo e alimento. O  
28 animal morto atropelado deixado na estrada, serve de alimento e isca à outros animais, que  
29 também podem ser mortos por atropelamento (Lima & Obara, 2004; Turci & Bernarde,  
30 2008).

31 Outro aspecto que contribui para o atropelamento de animais é a disponibilidade de  
32 alimentos na estrada, pois grãos e sementes caídos de caminhões atraem pequenos animais  
33 como roedores, aves e insetos (Steil et al., 2016).

34 O número e a diversidade de animais mortos em rodovias brasileiras aumentam a cada  
35 ano e o problema se agrava principalmente pelo aumento do fluxo de automóveis e também  
36 porque a rodovia corta áreas potencialmente ricas em fauna e flora, interferindo no  
37 deslocamento natural da espécie (Forman & Alexander, 1998; Rodrigues et al., 2002; Prada,  
38 2004).

39 Nas últimas décadas, os levantamentos quantitativos e qualitativos das ocorrências de  
40 atropelamento da fauna vêm sendo estudados (Vieira, 1996; Candido Jr. et al., 2002;  
41 Rodrigues et al., 2002; Prada, 2004; Pinowski, 2005; Cáceres, 2012; Hegel, 2012) assim  
42 como estudos helmintológicos com a identificação de endo e ectoparasitas (Cheadle et al.,  
43 2001; Nelder & Reeves, 2005; Griese, 2007; Ferroglio et al., 2009; Hoppe et al., 2009;  
44 Miquel et al., 2009; Sepulveda et al., 2013; Al-Sabi et al., 2014).

45 A utilização de técnicas moleculares para detectar agentes causadores de zoonoses em  
46 amostras de animais silvestres atropelados está em expansão. Matos et al., em 2014,  
47 realizaram a detecção molecular de *Mycobacterium bovis* em raposas em Portugal. No estado  
48 de São Paulo, não foi possível a detecção de *Mycobacterium leprae* (Pedrini et al., 2010).

49 A detecção molecular de protozoários como *Toxoplasma gondii* (Richini-Pereira et al.,  
50 2016), *Leishmania* spp. e *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) (Richini-Pereira et al., 2014) e

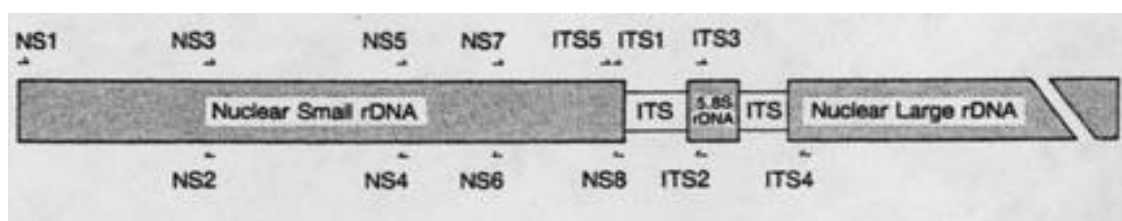
51 fungos como *Paracoccidioides brasiliensis* (Richini-Pereira et al., 2008; 2009), *Amauroascus*  
52 *aureus*, *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Emmonsia parva* e  
53 *Pichia stipitis* (Richini-Pereira et al., 2010) foi realizada no estado de São Paulo.

54         Desta forma, sabe-se que muitos animais silvestres de várias espécies têm sido  
55 apontados como importantes no processo evolutivo adaptativo de algumas espécies de fungos  
56 patogênicos. Este fato foi documentado em fungos queratinofílicos dos gêneros  
57 *Epidermophyton*, *Microsporium* e *Trichophyton* (Rippon, 1988), e os roedores silvestres tem  
58 sido considerados não somente portadores destes fungos, mas também por desempenharem  
59 importante papel na passagem da forma saprofítica para a parasitária (Mantovani et al., 1982).

60         Em relação aos principais fungos patogênicos causadores de micoses sistêmicas, a  
61 maioria apresenta tipicamente em comum o dimorfismo, distribuição geográfica localizada,  
62 ocorrência saprofítica em micro-nichos com produção de propágulos infectantes, os quais  
63 penetram o hospedeiro principalmente pelas vias respiratórias (Chakrabarti, 2005; Marques,  
64 1998).

65         Para identificação molecular de fungos patogênicos, pode-se utilizar diversas técnicas,  
66 sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a mais comum, permitindo a análise de  
67 polimorfismos em diferentes grupos de organismos, como os marcadores moleculares ITS  
68 (*Internal Transcribed Spacer*) que auxiliam na criação de bancos de dados de perfis genéticos  
69 para fins diagnósticos mais rápidos e precisos (Fungaro, 2000). As regiões ITS do DNA  
70 ribossomal são as sequências nucleotídicas mais utilizadas para sistemática e taxonomia de  
71 fungos no nível de gênero e espécie. São divididas em sub-regiões denominadas ITS1, ITS2 e  
72 o gene 5,8S ribossomal. As sequências ITS1 e ITS2 são empregadas na discriminação  
73 espécie-específica e possuem variabilidade e comprimentos relativamente semelhantes.  
74 Diferentes autores têm demonstrado a utilização de marcadores ITS na identificação de  
75 genótipos, no estudo da variabilidade genética, na discriminação entre isolados quanto à

76 taxonomia e na localização geográfica dos fungos (Lott et al., 1998; Henry et al., 2000;  
 77 Taylor et al., 2016). Essa região é considerada como um código de barras dos fungos, que  
 78 auxilia em uma rápida identificação de espécies, podendo gerar hipóteses de novas espécies e  
 79 guiar estudos de biodiversidade e ecológicos (Schoch et al., 2012; Xu, 2016) e para codificá-  
 80 la, há várias combinações de *primers* que podem ser usadas (White et al. 1990; Gardes &  
 81 Bruns, 1993; Ihrmark et al., 2012) A Figura 1 representa a região ITS e alguns *primers* que  
 82 podem ser utilizados.



83  
 84 **Figura 1:** Localização da região de DNA ribossomal ITS e alguns *primers* que podem ser  
 85 utilizados na PCR (White et al. 1990).

86  
 87 A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina  
 88 (Oliveira et al., 2015) ocorre em maior número na zona rural, afetando principalmente  
 89 agricultores, pois estes podem inalar os esporos ao lidar com o solo (Teixeira et al., 2014). Os  
 90 agentes etiológicos são os fungos termodimórficos do complexo *Paracoccidioides*,  
 91 pertencentes à ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, crescem em forma de micélio a  
 92 25°C e em forma de levedura a 37°C (Martinez, 2004; Untereiner, 2004; Teixeira et al.,  
 93 2013). A espécie *P. brasiliensis* era considerada a única responsável pela PCM, mas  
 94 recentemente os estudos demonstraram se tratar de um complexo de espécies crípticas: S1 –  
 95 encontrada em toda a América Latina e dividida recentemente em dois clados: S1a e S1b  
 96 (Muñoz et al, 2016) –, PS2 – Brasil e Venezuela –, PS3 – Colômbia – e PS4 – Venezuela –  
 97 (Matute et al., 2006; Theodoro et al., 2012; Salgado-Salazar et al., 2010) e a nova espécie, *P.*  
 98 *lutzii* com casos no Brasil e Equador (Teixeira et al., 2013).

99 A doença é contraída por meio da inalação dos conídios, as lesões em humanos são

100 ocasionadas na mucosa oral e consideradas secundárias em relação à disseminação do agente  
101 a partir dos pulmões (Franco et al., 1994; Londero et al., 1994; McEwen et al., 1987). Estudos  
102 mostram que o *P. brasiliensis* tem maior aptidão para se aderir às células do pulmão, quando  
103 comparado ao *P. lutzii*, e *in vitro* apresenta-se mais virulento do que o *P. lutzii*,  
104 correlacionando virulência e aderência (Oliveira et al., 2015).

105 A localização do fungo na natureza é bastante difícil, pois o período prolongado da  
106 doença dificulta a associação com a fonte de infecção e a ausência de surtos e a pouca  
107 repetibilidade nas tentativas de isolamento do fungo do ambiente não esclarecem seu nicho  
108 ecológico (Bagagli et al., 2008). Os humanos eram tidos como únicos hospedeiros  
109 naturalmente infectados por este fungo, porém, atualmente alguns animais silvestres e  
110 domésticos foram detectados como portadores da infecção (Ricci et al., 2004; Shikanai-  
111 Yasuda et al., 2006; Richini-Pereira et al., 2008; Farias et al., 2011.).

112 Utilizando técnicas sorológicas, Ricci et al. (2004) relataram o primeiro caso de cão  
113 doméstico infectado por *P. brasiliensis* e em 2011 um outro caso foi relatado por Farias et al.  
114 Em 2012, Corte et al. estudaram a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em cães da  
115 Amazônia no Brasil, encontrando positividade em 54,8% de um total de 126 cães. No estudo  
116 recente de Headley et al. (2016), foram realizados exames clínicos, citológicos,  
117 micopatológicos, sorológicos e moleculares em um cão da região Sul do Brasil e associaram a  
118 dermatite e linfadenite com *P. brasiliensis*.

119 No estudo de Sbeghen et al., em 2015, eles avaliaram por sorologia, amostras de 38  
120 animais silvestres de diferentes espécies, como *Akodon* spp., *Thaptomys nigrita*,  
121 *Euryoryzomys russatus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Monodelphis* spp., *Sooretamys angouya*,  
122 *Abrawayaomys angouya*, *Abrawayaomys ruschii* e *Akodontinae* spp. que resultou em 23,7%  
123 de positividade no teste ELISA. Estudos sugerem que o fungo seja sapróbio e se desenvolve  
124 em vários tipos de solo, pois já foi isolado no ambiente (Franco et al., 2000; Restrepo et al.,

125 2001; Terçarioli et al., 2007). Em alguns animais silvestres, foi realizado com sucesso o  
126 isolamento, sorologia e detecção molecular do fungo (Conti-Díaz et al., 1972; Costa et al.,  
127 1995; Corte et al., 2007; Richini-Pereira et al., 2008; 2009; Albano et al., 2014).

128 Estudos apontam que tatus da espécie *Dasypus novemcintus* apresentam-se infectados  
129 por *P.brasiliensis* com alta frequência em regiões endêmicas de Paracoccidioidomicose,  
130 sendo considerados indicadores epidemiológicos de ocorrência desse patógeno (Corredor et  
131 al., 1999; 2005; Macedo et al., 1999; Restrepo et al., 2000; Silva-Vergara et al., 2000; Bagagli  
132 et al., 2003).

133 Deste modo, o estudo de *Paracoccidioides brasiliensis* em animais silvestres é  
134 importante para entender melhor sobre sua eco-epidemiologia, pois não se sabe muito ainda  
135 sobre o papel dos animais como carreadores ou reservatório do patógeno.

136 Histoplasmose consiste em uma infecção fúngica ocasionada pelo fungo dimórfico  
137 *Histoplasma capsulatum*, causando sintomas principalmente em pacientes imunodeprimidos.  
138 Ocorre no mundo todo, porém endêmico nos Estados Unidos e América Latina.

139 Comumente associado a solos contaminados com fezes de aves e morcegos infectados  
140 (González-González et al., 2014; Furuie et al., 2016), a histoplasmose é uma das causas mais  
141 comum de micoses em animais, incluindo o homem no Brasil (Medeiros Muniz et al., 2010).

142 Até recentemente, acreditava-se que *H. capsulatum* era composto somente por três  
143 variações com distribuição geográfica e manifestações clínicas distintas: var. *capsulatum*  
144 (patógeno humano do Novo Mundo), var. *duboisii* (patógeno humano Africano) e var.  
145 *farcinosum* (um patógeno de cavalo do Velho Mundo) (Kasuga et al., 1999; 2003). Porém,  
146 estudos recentes, demonstraram que *Histoplasma capsulatum* é um complexo de oito clados  
147 geograficamente distribuídos em: Austrália, Holanda, Eurásia, América do Norte classes 1 e 2  
148 (NAm 1 e NAam 2), América Latina grupos A e B (LAm A e LAm B) e África (Theodoro et  
149 al., 2013; Teixeira et al. 2016).

150 A epidemiologia do patógeno se relaciona com as condições nas quais o homem pode  
151 adquirir a infecção por atividades relacionadas ao meio rural como o trabalho, viagem ou  
152 lazer (Ericsson et al., 2002). O fungo é saprófita, se apresenta no solo sob a forma filamentosa  
153 e no organismo do hospedeiro sua forma é leveduriforme (Brooks et al., 2000; Lacaz 2002).  
154 A infecção humana é causada ao aspirar conídios encontrados em solos de cavernas, celeiros,  
155 galinheiros e florestas que contém excrementos de aves e morcegos com alto teor de  
156 nitrogênio (Wheat & Kauffman, 2003).

157 O fungo causa doença respiratória e sistêmica em hospedeiros mamíferos (Edwards et  
158 al., 2013).

159 Os morcegos são animais com grande importância na eco-epidemiologia da  
160 Histoplasmose, pois há vários estudos com estes e todos são bem estabelecidos. Em 1973, no  
161 Brasil, foi publicado o primeiro isolamento de *H. capsulatum* a partir de solo do interior de  
162 cavernas e de vísceras e sangue de morcegos capturados que habitavam o local em Brasília-  
163 DF (Schmidt et al., 1973). O voo desses animais pode espalhar os conídios que causam a  
164 infecção (Jülg et al., 2008). Em 1995, Suzaki et al. descreveram um estudo sobre a  
165 ocorrência de histoplasmose pulmonar aguda em turistas japoneses que visitaram cavernas  
166 com presença de fezes de morcegos.

167 Os conídios se desenvolvem no pulmão causando a primeira infecção. Em grande  
168 parte dos pacientes esta forma clínica é assintomática ou então semelhante a sintomas de  
169 resfriados, deixando calcificações residuais nodulares no pulmão, parecidas com as de  
170 tuberculose. Indivíduos transplantados, maiores de 60 anos ou menores de um ano, fazendo  
171 quimioterapia ou portadores de HIV podem apresentar a forma disseminada da infecção  
172 (Trabulsi,1998; Flor et al.,2003; Lacaz, et al., 2002; Negroni et al., 2004; Sidrin et al., 2004).

173 Em um estudo de González-González et al. (2014) foram avaliados 122 morcegos da  
174 Argentina, Guiana Francesa e México e resultou em 98 morcegos infectados pelo fungo.

175 Apesar de muitos estudos correlacionarem morcegos com a dispersão involuntária do *H.*  
176 *capsulatum*, o potencial desses animais na propagação do fungo na natureza permanece  
177 incerto (González-González et al., 2014). Há também estudos de outros animais silvestres  
178 como carreadores do fungo, com o isolamento em fígado e baço de *H. capsulatum* em um  
179 roedor *Rattus rattus* e em dois marsupiais *Metachirus opossum* no Rio de Janeiro (Zancopé-  
180 Oliveira & Wanke, 1986).

181 Criptococose é uma infecção fúngica sistêmica, cosmopolita e emergente, que ocorre  
182 como resultado da interação do hospedeiro susceptível com o ambiente, acometendo humanos  
183 e outros animais. O gênero *Cryptococcus* possui diversas espécies, sendo *Cryptococcus*  
184 *neoformans* e *Cryptococcus gatti* consideradas as de maior importância em saúde pública,  
185 (Takahara et al., 2013; Favalessa et al., 2014). Ambos os agentes etiológicos são  
186 leveduriformes, encapsulados, com formato redondo ou oval com brotamento único ou  
187 múltiplo.

188 Ocorre de duas maneiras distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico:  
189 criptococose oportunista que é causada predominantemente pelo *Cryptococcus neoformans*, e  
190 está associada a condições de imunodepressão celular e a criptococose primária, causada pelo  
191 *Cryptococcus gatti*, onde o hospedeiro é imunocompetente, ocorre mais comumente em áreas  
192 endêmicas tropicais. Independente do agente causador, ambas causam meningoencefalite que  
193 pode ter evolução fatal, com presença ou não de lesões pulmonares e focos secundários em  
194 outros órgãos como pele e rim (Kon et al., 2008).

195 *C. neoformans* é cosmopolita e encontrado na natureza em árvores, em substratos  
196 orgânicos, associado com frequência a habitat de aves em fezes secas ricas em fontes de  
197 nitrogênio como a creatinina e a ureia, pode viver saprofiticamente no organismo de humanos  
198 e dos animais domésticos e silvestres (Kwon-Chung et al., 1984; Swinne et al., 1989; Swinne  
199 et al., 1986; Ellis & Pfeiffer, 1992; Lazéra et al., 1996). A porta de entrada para o fungo é a

200 via inalatória, acomete humanos, principalmente indivíduos adultos, animais silvestres e  
201 mamíferos domésticos como cães e gatos (Malik et al., 1997; Larsson et al., 2003; Pereira &  
202 Coutinho, 2003; Honsho et al., 2003; Pappalardo & Melhem, 2003; Taboada, 2004).

203 *C. gattii* encontra-se presente em folhas, partes ocas do tronco e madeira em  
204 decomposição de árvores pertencentes às espécies australianas *Eucalyptus camaldulensis* e *E.*  
205 *tereticornis*, além de árvores nativas de espécies existentes em regiões dos continentes de  
206 clima tropical e subtropical (Sorrel, 2001; Randhawa et al., 2003, McMullan et al., 2013).

207 As espécies de *Cryptococcus* se agrupam em um complexo de oito tipos moleculares  
208 que se diferem quanto aos aspectos epidemiológicos, geográficos e a gravidade da doença  
209 (Trilles et al., 2012), sendo os tipos moleculares VNI, VNII, VNIII e VNIV para *C.*  
210 *neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV para *C. gatti* (Saijo et al., 2014; Hagen et al., 2015).

211 Outros animais além das aves podem se infectar com o patógeno, provavelmente por  
212 meio da inalação dos propágulos do fungo (Bui et al., 2008). Em 1952, foi descrito o primeiro  
213 caso em gatos e no ano seguinte o primeiro em cães (Holzworth, 1952; Seibold et al., 1953).  
214 Já havia discussões sobre a origem da infecção no Sistema Nervoso Central de animais  
215 domésticos (Araújo Júnior, 2014).

216 Em Florianópolis – Santa Catarina, um estudo realizado no ano 2008, identificou uma  
217 positividade de 10% de 40 amostras de fezes de pombo coletadas na cidade (Garcia, 2008).  
218 No ano de 2009, no estado de Oregon –EUA, Byrnes et al. (2009), isolaram o fungo de um  
219 cão com infecção no Sistema Nervoso Central com sintomas como vômito, diarreia e  
220 anorexia. Também no estado de Santa Catarina, no município de Lages, foi feito um estudo  
221 para isolamento e diagnóstico de *Cryptococcus* spp. em 195 amostras de fezes de pombos de  
222 praças da cidade e resultou em uma positividade de 7,69% (Menezes, 2014).

223 O gênero *Aspergillus* tem um alto impacto econômico e social e é composto por mais  
224 de 300 espécies de acordo com a caracterização filogenética (Samson et al., 2014). É

225 composta por fungos sapróbios, cosmopolitas e amplamente distribuídos na natureza sendo  
226 encontradas no solo, ar, poeira, roupas, ar condicionado, antissépticos, grãos e sementes,  
227 conhecido por deteriorar alimentos e produzir micotoxinas. Algumas espécies são usadas para  
228 a produção de fármacos, enzimas e na fermentação, porém cerca de 30 espécies causam  
229 infecções que usualmente são oportunistas e frequentemente reportadas como patógenos em  
230 diversos tipos de hospedeiros, como insetos, aves e mamíferos, incluindo humanos (Pitt,  
231 1994; Sidrim & Rocha, 2004; Heitman, 2011; Samson et al., 2014).

232 A presença deste fungo no ambiente é responsável por provocar reações alérgicas ou  
233 então aspergilose invasiva e doença disseminada em um hospedeiro imunossuprimido  
234 (Carvalho, 2013). Ao penetrar nos hospedeiros principalmente por via respiratória, o  
235 *Aspergillus* se aloja preferencialmente nos brônquios e seios nasais do hospedeiro, este  
236 desenvolvendo doenças (Sidrim & Rocha, 2004) e quando infectado, pode sofrer com uma  
237 micose sistêmica atingindo diversos órgãos internos, como baço, fígado, ossos e olhos (Klein  
238 & Gamsu, 1980; Smith et al., 1998; Harkin, 2003).

239 Existem relatos de animais como cães, pinguins e outros animais silvestres infectados  
240 pelo fungo (Xavier et al., 2006; Sanches & Coutinho, 2007; Richini-Pereira et al., 2010),  
241 sendo *A. fumigatus* o mais encontrado e responsável por aproximadamente 90% dos casos  
242 diagnosticados de aspergilose invasiva (Araujo et al., 2005), possivelmente por seu conídio se  
243 dispersar mais que os demais (Kwon-Chung & Sugui, 2013). As outras espécies relacionadas  
244 como principais responsáveis são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*  
245 e *Aspergillus terreus* (Jiang et al, 2013, Martins et al, 2005; Murray et al, 2006).

246 *Aspergillus penicillioides* foi descrito pela primeira vez, após análises de cana de  
247 açúcar mofada (Thom & Church, 1926) e é encontrado no mundo todo em poeira e água com  
248 pouca atividade (Meklin et al., 2004, 2007; Stevenson et al., 2016), porém já foi isolado de  
249 grãos, sementes, peixe seco (Pitt et al., 2009) e noz-pecã (Moraes et al., 2015). Sua

250 distribuição ocorre principalmente em locais com clima temperado, mediterrâneo ou tropical.  
251 A ocorrência do fungo é influenciada pelo clima, ocorrendo em maior número nos trópicos e  
252 menor em clima mediterrânico. O tempo frio tende a diminuir o número de *A. penicilliioides*  
253 em poeiras domésticas (Bossche 1988).

254 Em humanos, pode causar rinites (Hamilos, 2010), e também há um relato de um caso  
255 onde uma criança de três meses de vida sob suspeita de fibrose-cística, que desenvolveu  
256 aspergilose disseminada e por meio de técnica molecular foi identificado o fungo *A.*  
257 *penicilliioides* (Gupta et al., 2015).

258 A importância da aspergilose em humanos e em outros animais aumentou, pois as  
259 espécies do fungo são encontradas em todo o mundo em humanos e em quase todos os  
260 animais domésticos, aves e em muitas espécies selvagens, causando doenças fatais e  
261 localizadas (Seyedmousavi et al., 2015).

262 Outra potente ferramenta para estudos eco-epidemiológicos é a utilização do Sistema  
263 de Informação Geográfica (SIG), a qual já vem sendo amplamente utilizada na análise da  
264 distribuição geográfica e dinâmica de diversas doenças, das mais variadas etiologias  
265 (Peterson, 2001; Kirby et al., 2017), inclusive no estudo da paracoccidioidomicose (Simões et  
266 al., 2004; Vieira et al., 2014; Arantes et al., 2016 ).

267 A identificação de animais domésticos e silvestres infectados por fungos patogênicos  
268 é importante para monitorar a ocorrência dos mesmos em uma determinada região e  
269 estabelecer indicadores ambientais facilmente mapeáveis, permitindo a identificação das  
270 áreas de risco à infecção, pois estes atuam como marcadores epidemiológicos para a presença  
271 do micro-organismo, indicando a existência de fontes de infecção para humanos e animais  
272 (Canteros et al., 2004).

273

274

275

276 **Objetivos**

277

278 Avaliar, por meio de técnicas de Biologia Molecular como PCR e Nested-PCR, a  
279 ocorrência de fungos causadores de doenças de interesse em saúde pública, em exemplares de  
280 animais silvestres atropelados, podendo deste modo, identificar e mapear áreas de risco para a  
281 infecção humana.

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

## Referências

1. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre ya los animales. Pub. Científica. 1986; 503.
2. Albano APN, Klafke GB, Brandolt TM, Da Hora VP, Minello LF, Jorge S, Meireles MCA. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mycopathologia. 2014; 177(3-4): 207-215.
3. Al-Sabi, MNS, Halasa T, Kapel CMO. Infections with cardiopulmonary and intestinal helminths and sarcoptic mange in red foxes from two different localities in Denmark. Acta Parasitologica. 2014; 59(1): 98-107.
4. Arantes TD, Theodoro RC, de Melo Teixeira M, Bosco SDMG, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. PLOS Negl Trop Dis, 2016; 10(4), e0004606.
5. Araújo Júnior EC, Táparo CV, Uchida CY, Marinho M. Cryptococcus: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2015; 67(4): 1003-1008.
6. Araujo R, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Surveillance of airborne *Aspergillus* in a Portuguese University Hospital. Mycoses, 2005; 48(2):45.
7. Bagagli E, Franco M, Bosco SDM, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. Med. Mycol. 2003; 41(3): 217-223.
8. Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Morner T, Tate CM. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. Rev. Sci. Tech. 2004; 23(2): 497-512.
9. Bidaisee S, Macpherson CN. Zoonoses and one health: a review of the literature. J. Parasitol. Res. 2014; 874345. doi: 10.1155/2014/874345.

10. Bossche, edited by Hugo Vanden; Mackenzie, Donald W.R.; Cauwenbergh, Geert. *Aspergillus and aspergillosis*. New York: Plenum Press. 1988; p. 37.
11. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Microbiologia Médica*. 21<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
12. Bui T, Lin X, Malik R, Heitman J, Carter D. Isolates of *Cryptococcus neoformans* from infected animals reveal genetic exchange in unisexual,  $\alpha$  mating type populations. *Eukaryotic cell*. 2008; 7(10): 1771-1780.
13. Byrnes EJ, Bildfell RJ, Dearing PL, Valentine BA, Heitman J. *Cryptococcus gattii* with bimorphic colony types in a dog in western Oregon: additional evidence for expansion of the Vancouver Island outbreak. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2009; 21(1): 133-136.
14. Cáceres NC, Casella J, Goulart CS. Variação espacial e sazonal de atropelamentos de mamíferos no bioma cerrado, rodovia BR 262, Sudoeste do Brasil. *Mastozool. Neotrop*. 2012; 19(1): 21-33.
15. Cândido Jr JF, Margarido VP, Pegoraro JL, D'amico AR, Madeira WD, Casale VC, Andrade L. Animais atropelados na rodovia que margeia o Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil, e seu aproveitamento para estudos da biologia da conservação. III Brasileiro de Unidades de Conservação: Anais do III Brasileiro de Unidades de Conservação, Fortaleza. 2002. P:553-562.
16. Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, Varela E. First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*. *Rev. Argent. Microbiol*. 2004; 37(1): 46-56.
17. Carvalho LIC. *Aspergillus e Aspergilose [Dissertação]*. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2013.

18. Chakrabarti A. Microbiology of systemical fungal infections. J. Postgrad. Med., v. 51 supl. 1, p. 16-20, 2005.
19. Cheadle MA, Tanhauser SM, Dame JB, Sellon DC, Hines M, Ginn PE, Greiner EC The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. Int. J. Parasitol. 2001; 31(4): 330-335.
20. Conti-Diaz IA, Alvarez BJ, Gezuele E, Gonzalez MH, Duarte J, Falcon J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo. 1972; 14:372-376.
21. Corredor GG, Castaño JH, Paralta A, Díez S, Arango M, McEween J, Restrepo A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Columbia. Rev. Iberoam. Micol. 1999; 16(4): 216-220.
22. Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Restrepo A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. Med. Mycol. 2005; 43(3): 275-280.
23. Corte AC, Gennari SM, Labruna MB, Camargo L, Itano EN, Freire RL, Ono MA. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. Pesqui. Vet. Bras. 2012; 32(7): 649-652.
24. Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. Mycopathologia. 2007; 164: 225-228.
25. Costa EO, Diniz LS, Netto CF, Arruda C, Dagli ML. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. J. Med.Vet. Mycol. 1995; 33: 39-42.
26. Denning DW, Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26:781-803

27. Edwards JA, Chen C, Kemski MM, Hu J, Mitchell TK, Rappleye CA. Histoplasma yeast and mycelial transcriptomes reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. *BMC genomics*. 2013; 14(1): 1.
28. Ellis D, Pfeiffer T. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* 1992; 8(3): 321-325.
29. Ericsson CD, Steffen R, Panackal AA, Hajjeh R., Cetron MS, Warnock DW. Fungal infections among returning travelers. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35(9): 1088-1095.
30. Farias MR, Condas Laz, Ribeiro MG, Bosco SDMG, Muro MD, Werner, J, Franco M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 2011; 172(2): 147-152.
31. Favalessa OC, Paula DAJD, Dutra V, Nakazato L, Tadano T, Lazera MDS, Hahn RC. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp. from patients in Midwest Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014; 8(8): 1037-43.
32. Ferroglio E, Ragagli C, Trisciuglio A. *Physaloptera sibirica* in foxes and badgers from the Western Alps (Italy). *Vet. Parasitol*, 2009; 163(1): 164-166.
33. Flor A, Estivill D, Pérez R, Ordeig J, Ramos F, Bel JS, Puig X. Histoplasmosis Pulmonar Aguda En Un Viajero Español a Nicaragua: Ejemplo de Enfermedad Importada. *Rev. Iberoam. Micol.* 2003; 20: 24-28.
34. Forman RT, Alexander LE. Roads and their major ecological effects. *Annual review of ecology and systematics.* 1998; 29: 207-231.
35. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med. Mycol.* 2000; 38(3): 185-91.
36. Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds) *Paracoccidioidomycosis*, 1st edition, CRC Press, Boca Raton. 1994: 393-405.

37. Fungaro MHP. PCR na micologia. *Biotecnologia cienc. desenvolv*, 2000; 3: 12-16.
38. Furuie JL, Sun J, Nascimento MM, Gomes RR, Waculicz-Andrade CE, Sessegolo GC, Najafzadeh MJ. Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using rolling circle amplification. *Mycoses*. 2016; 59(1): 12-19.
39. Garcia LC. Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina. 2008.
40. Gardes M, Bruns T. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 1993; 2:113–118.
41. Gebreyes WA, Dupouy-Camet J, Newport MJ, Oliveira CJ, Schlesinger LS, Saif YM, Hoet A. The global one health paradigm: challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014; 8(11): 3257.
42. González-González AE, Aliouat-Denis CM, Ramírez-Bárcenas JA, Demanche C, Pottier M, Carreto-Binaghi LE, Taylor ML. *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis* spp. co-infection in wild bats from Argentina, French Guyana, and Mexico. *BMC Microbiol*. 2014; 14(1):1.
43. Griese, J. Helmintofauna de vertebrados atropelados em rodovias da região de Botucatu, São Paulo [Dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências; 2007.
44. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parmen S, Lumbsch HT, Boekhout T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol*. 2015; 78: 16–48.
45. Harkin KR. Aspergillosis an overview in dogs and cats. *Vet Med*. 2003; 98(7):602-18.

46. Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, Gomes LA, Macagnan R, da Nóbrega DF, et al. Paracoccidioides brasiliensis-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. Mycopathol. 2016; 1-10.
47. Hegel CGZ. Mamíferos silvestres atropelados na rodovia RS-135 e entorno. Biotemas. 2012; 25(2): 165-170.
48. Heitman J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. Fungal Biol Rev 2011; 25(1): 48–60.
49. Holzworth J. Cryptococcosis in a cat. Cornell Vet. 1952; 42: 12-15.
50. Honsho CS, Mine SY, Oriá AP, Benato N, Camacho AA, Alessi AC, Laus JL. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2003; 55(2): 155-159.
51. Hoppe EGL, Araújo de Lima, RC, Tebaldi JH, Athayde ACR, Nascimento AAD. Helminthological records of six-banded armadillos *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) from the Brazilian semi-arid region, Patos county, Paraíba state, including new morphological data on *Trichohelix tuberculata* (Parona and Stossich, 1901) Ortlepp, 1922 and proposal of *Hadrostrongylus ransomi* nov. comb. Braz. J. Biol. 2009; 69(2): 423-428.
52. Ihrmark K, Bödeker ITM, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandström-Durling M, Clemmensen KE, Lindahl BD. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. FEMS Microbiol Ecol, 2012; 82:666–677.
53. Jenkins EJ, Simon A, Bachand N, Stephen C. Wildlife parasites in a One Health world. Trends Parasitol. 2015; 31(5): 174-180.

54. Jiang Z, Wang Y, Jiang Y, Xu Y, Meng B. Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to *Aspergillus nidulans* resulting in spinal cord compression: Case report and literature review, *J Int Med Res*, 2013; 41(2):502–510.
55. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008; 451(7181): 990-993.
56. Jülg B, Elias J, Zahn A, Köppen S, Becker-Gaab C, Bogner JR. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. *J. Travel Med*. 2008; 15(2): 133-6.
57. Kasuga T, Taylor JW, WHITE TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(3):653-663.
58. Kasuga T, White TJ, Koenig G, Mcewen J, Restrepo A, Castaneda E, Qin Z. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol*. 2003; 12(12): 3383-3401.
59. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Myers SS. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*. 2010; 468(7324): 647-652.
60. Klein DL, Gamsu G. Thoracic manifestations of aspergillosis. *AJR Am J Roentgenol*. 1980; 134:543–552.
61. Kon AS, Grumach AS, Colombo AL, Penalva ACO, Wanke B, Telles FQ, et al. Consenso em criptococose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2008; 41:524-44.
62. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Amer. Jour. Epidem*, 1984; 120: 123-130.

63. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*-what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog* 2013; 9(12): e1003743
64. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EMH, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª edição. São Paulo: Editora Sarvier; 2002.
65. Larsson CE, Otsuka M, Michalany NS, Barroa PSM, Gambale W, Safatle AMV. Canine ocular cryptococcosis: a case report. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2003; 55(5): 533-538.
66. Laurance WF, Goosem M, Laurance SG. Impacts of roads and linear clearings on tropical forests. *Trends Ecol Evol.* 2009; 24: 659-669.
67. Lazera MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* 1996; 34(2): 127-131.
68. Lima SF, Obara AT. Levantamento de animais silvestres atropelados na BR-277 às margens do Parque Nacional do Iguaçu: subsídios ao programa multidisciplinar de proteção à fauna. VII Semana de Artes da Universidade Estadual de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 2004.
69. Londero AT, Wanke B. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds) *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton. 1994; p.109-120.
70. Macedo RCL, Lazera MS, Trilles L, Bulcao AS, Silva Jr NJ, Oliveira NA, Wanke B. *Paracoccidioides brasiliensis* - Infecção natural em tatus. Estudo em Serra da Mesa, Goiás, Brasil. In *Proceedings da VII International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. 1999.
71. Malik R, Wigney DI, Muir DB, Love DN. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. *J. Med. Vet. Mycol.* 1997; 35(1): 25-31.

72. Mantovani A, Morganti L, Battelli G, Mantovani A, Poglayen G, Tampieri MP, Vecchi G. The role of wild animals in the ecology of dermatophytes and related fungi. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1982; 29: 279-284.
73. Marques AS. Paracoccidioidomicose. *An. Bras. Dermatol.* 1998; 73(5): 455-469.
74. Martinez R. Paracoccidioidomicose. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 204-21.
75. Martins JEC, Melo NT, Heins-Vaccari EM. *Atlas de Microbiologia Médica*, Copyright, Editora Manole Ltda, 2005; pp. 39-45.
76. Matos AC, Figueira L, Santos M, Martins MH, Dias AP, Morais M, Matos M. Prevalência da infecção de *Mycobacterium bovis* em quatro famílias de carnívoros selvagens em Portugal. VI Jornadas Nacionais de Genética e Biotecnologia. 2014.
77. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23(1): 65.
78. Mcewen JG, Bedoya V, Patiño Mm, Salazar Me, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 1987; 25: 165-175.
79. McMullan BJ, Sorrell TC, Chen SC. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. *Future Microbiol.* 2013; 8: 1613-31.
80. Medeiros MM, Meyer W, Nosanchuk JD, Zancope-Oliveira RM. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(13): 4438-4447.
81. Meklin T, Haugland RA, Reponen T, Varma M, Lummus Z, Bernstein D, Wymer LJ,

Vesper SJ. J Environ Monit. 2004 Jul;6(7):615-20.

82. Menezes T, Scain G, de Quadros RM, Miletti LC, Souza AL, de Lima Miguel R, Marques SMT. *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos (*Columba livia*) de áreas públicas de Lages, Santa Catarina. Sci. Animal Health. 2014; 2(2): 102-114.

83. Miquel J, Foronda P, Torres J, Swiderski Z, Feliu C. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), an intestinal parasite of *Felis catus* from La Palma (Canary Islands, Spain) Parasitol. Res. 2009; 104(6):1477–1483.

84. Moraes VM, Garcia MV, Bernardi AO, dos SantosD, Copetti MV. Micobiota de nozes-pecã gaúchas. 5º Simpósio de Segurança Alimentar: Alimentação e Saúde; 2015 Mai 26-29; Bento Gonçalves, Brasil, 2015.

85. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, Teixeira MDM. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of Paracoccidioides. mSphere, 2016;1(5).

86. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia: Médica, 5º edição, Elsevier Editora Ltda; 2006; p. 770-773

87. Negroni R, Helou SH, Daneri GL, Robles AM, Arechavala AI, Bianchi MH. Interrupción de la Profilaxis Secundaria Antifúngica em la Histoplasmosis Asociada al Sida. Rev Iberoam. Micol. 2004; 21: 75-78.

88. Nelder MP, Reeves WK. Ectoparasites of road-killed vertebrates in northwestern South Carolina, USA. Vet. Parasitol. 2005;1 29(3):313-322.

89. Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM, Scorzoni L, Silva ACDPE, Da Silva JDF, Mendes-Giannini MJ. Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. Front Microbiol. 2015;6.

90. Osuna A, Carragoso A, Lemos A, Mocho ML, Gaspar O. Criptococose. Acta Medica Portuguesa. 2008; 21: 307-313.
91. Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2003;45(6): 299-305.
92. Pedrini SCB, Rosa PS, Medri ÍM, Mourão G, Bagagli E, Lopes CADM. Search for *Mycobacterium leprae* in wild mammals. Braz. J. Infect. Dis. 2010; 14(1): 47-53.
93. Pereira APC, Coutinho SDA. Criptococose em cães e gatos – revisão. Rev. Clin. Vet., 2003; 8(45): 24-32.
94. Peterson AT. 2001 Predicting species' geographic distributions based on ecological niche modeling. Condor, 2001; 103: 599–605.
95. Pinowski, J. Roadkills of vertebrates in Venezuela. Rev. Bras. Zoo. 2005;22(1): 191-196.
96. Pitt JI, Ailsa DH. Fungi and food spoilage. Vol. 519. New York: Springer, 2009.
97. Pitt JI. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. J Med Vet Mycol 1994; 32(S1): 17–32.2.
98. Prada CDS. Atropelamento de vertebrados silvestres em uma região fragmentada do nordeste do estado de São Paulo: quantificação do impacto e análise de fatores envolvidos. Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais [tese]. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos; 2004.

99. Preston ND, Daszak P, Colwell RR. The human environment interface: applying ecosystem concepts to health. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;365: 83-100.
100. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol*. 2003; 41(3): 199-209.
101. Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, Jr CC, McGinnis MR, Lazera MS, Fortes ST. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med. Mycol*. 2000; 38(1): 67-77.
102. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol*. 2004; 42(4): 379-383.
103. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griese J, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med. Mycol*. 2008; 46(1):35-40.
104. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Barrozo L, Bagagli E. Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. 2010; 16(4): 607-613.
105. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, et al. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC Res Notes*. 2009; 2:1-6.
106. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. 2014; 20(1): 1.
107. Richini-Pereira VB, Marson PM, Silva RCD, Langoni H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2016; 49(5): 602-607.

108. Rippon JW. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1988.
109. Rodrigues FHG. Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF [dissertação] Campinas: Unicamp; 2002.
110. Saijo T, Chen J, Chen SCA, et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. MBio. 2014; 5(2): 12-14.
111. Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, McEwen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. Cladistics. 2010; 26: 12.
112. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Varga J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology, 2014; 78:141-173.
113. Sbeghen MR, Zanata TB, Macagnan R, Abreu KC, Cunha WL, Watanabe MAE, Camargo ZP, Ono MA. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. Rev. Mycopat. 2015;180: 435–440.
114. Schmidt S, Machado OP, Galvão AB. Microepidemia de histoplasmose em zona rural de Brasília-DF. II Estudo epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1973; 7: 107-115.
115. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci, 2012; 109:6241 –6246.
116. Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Singulani JDL, Leite FS, de Oliveira HC, Moraes da Silva RA, Mendes-Giannini MJS. Comparison of virulence between *Paracoccidioides*

*brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. Virulence. 2015; 6(8): 766-776.

117. Seibold HR, Roberts, C. S., & Jordan, E. M. Cryptococcosis in a dog. J Am Vet Med Assoc ,1953; 122(912).

118. Sepulveda MS, Kinsella JM. Helminth collection and identification from wildlife. Journal of visualized experiments: JoVE. 2013;82.

119. Sevegnani L, Schroeder E. Biodiversidade catarinense: características, potencialidades, ameaças. Blumenau: Edifurb, 2013.

120. Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers W J, Verweij PE.. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. Med mycol, 2015.

121. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39(3): 297-310.

122. Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. In: Sidrim JJC, Cordeiro RA, Rocha MFG. Aspergilose e Fusariose. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004; p. 275-282.

123. Sidrin JJC, Rocha MFG. Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.

124. Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZPD, Malta MHB, Maffei CML, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. Med. Mycol. 2000; 38(3): 193-199.

125. Simões LB, Marques SA, Bagagli E. Distribution of Paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through Geographic Information System and spatial analyzes. *Med. Mycol.*, 2004; 42(6): 517-23.
126. Smith SA, Andrews G, Biller DS. Management of nasal aspergillosis in a dog with a single, noninvasive intranasal infusion of clotrimazole. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1998;34(6):487-92
127. Smith-Patten BD, Patten MA. Diversity, seasonality, and context of mammalian roadkills in the southern Great Plains. *Environ. Microbiol.* 2008; 41(6): 844-852.
128. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* 2001; 39(2):155-168.
129. Steil L, Düpont A, Lobo E. Levantamento da fauna silvestre atropelada na BR 290 (Km 210 a 214), município de Pantano Grande, RS, Brasil. *Caderno de Pesquisa.* 2016; 28(1):13-23.
130. Stevenson A, Hamill PG, Dijksterhuis J, Hallsworth JE. *Microb Biotechnol.* 2016
131. Suzaki A, Kimura M, Kimura S, Shimada K, Miyaji M, Kaufman L. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. *Kansenshogaku zasshi.* 1995;69(4): 444-449.
132. Swinne D, Deppner M, Laroche R, Floch JJ, Kadende P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). *AIDS.* 1989; 3: 389-390.
133. Swinne D, Nkurikiyinfura JB, Muyembe TL. Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Zaire. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1986; 5: 50-51.

134. Taboada J. 2004. Micoses Sistêmicas. In: Ettinger SJ, Feldman EC (Eds). Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.478-503.
135. Takahara DT, Lazera MDS, Wanke B, Trilles L, Dutra V, Paula DAJD, Paula CR. First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2013; 55(6): 371-376.
136. Taylor, D. L., Walters, W. A., Lennon, N. J., Bochicchio, J., Krohn, A., Caporaso, J. G., & Pennanen, T. Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. Appl Environ Microbiol, 2016; 82(24):7217-7226.
137. Teixeira MD, Theodoro RC, Oliveira FF, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. Med. Mycol. 2013; 52: 19–28.
138. Teixeira MM, Patané JS, Taylor ML, Gómez BL, Theodoro RC, de Hoog S, Engelthaler DM, Zancopé-Oliveira RM, Felipe MS, Barker BM. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. PLoS Negl. Trop. Dis. 2016; 10(6).
139. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. PLoS Pathog. 2014; 10(10): e1004397.
140. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC Microbiol. 2007; 7(1): 1.

141. Theodoro RC, Scheel CM, Brandt ME, Kasuga, T, Bagagli E. . PRP8 intein in cryptic species of *Histoplasma capsulatum*: evolution and phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013; 18:174-182.
142. Theodoro RC, Teixeira MM, Felipe MS, et al. Genus paracoccidioides: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS ONE*. 2012;7: e37694.
143. Thom C, Church M. *The Aspergilli*. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins. 1926; p. 28,75,126.
144. Thompson RCA, Kutz SJ, Smith A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2009; 6: 678-693.
145. Trabulsi LR. *Microbiologia*. 2ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu; 1998.
146. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med. Mycol.* 2012;50(3): 328-332.
147. Turci LCB, Bernarde PS. Vertebrados atropelados na rodovia estadual 383 em Rondônia, Brasil. *Biotemas*. 2009; 22(1): 121-127.
148. Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Sigler L, Bachewich J, Angus A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia*. 2004; 96(4): 812-821.
149. Vieira EM. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Ciência Cultura*. 1996; 48: 270-272.
150. Vieira GDD, Alves TDC, Lima SMDD, Camargo LMA, Sousa CMD. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2014; 47(1): 63-68.

151. Wheat LJ, Kauffman CA. Histoplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2003; 17(1):1-19.
152. Xu, J. . Fungal DNA barcoding 1. *Genome*, 2016; 59(11):913-932.
153. Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no município do Rio de Janeiro. *Cadernos Saúde Pública.* 1986; 2(1): 42-52.

# *Capítulo 2*

1 **Molecular detection of important fungi for public health in brazilian wild**  
2 **animals**

3 Short Title: Pathogenic fungi in wild animals

4

5 Debora de Oliveira Losnak<sup>1¶</sup>; Francielle Ramalho Rocha<sup>2¶</sup>; Barbara Soares de Almeida<sup>2&</sup>;

6 Keila Zaniboni Siqueira Batista<sup>3&</sup>; Sergio Luiz Althoff<sup>4&</sup>; Josiane Haupt<sup>5&</sup>; Luciana Da Silva

7 Ruiz<sup>2&</sup>; Laís Anversa<sup>2&</sup>; Simone Baldini Lucheis<sup>7&</sup>; Laís Moraes Paiz<sup>6&</sup>; Virginia Bodelão

8 Richini Pereira<sup>2¶\*</sup>.

9

10 <sup>1</sup> Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis, Botucatu Medical School, Unesp -  
11 Univ Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.

12 <sup>2</sup> Adolfo Lutz Institute, Center of Regional Laboratories II - Bauru, Center of Biomedical  
13 Science, Brazil

14 <sup>3</sup> Laboratory of Immunology, Department of Natural Sciences, Regional University of  
15 Blumenau, Blumenau-SC, Brazil

16 <sup>4</sup> Laboratory of Animal Biology, Department of Natural Sciences, Regional University of  
17 Blumenau, Blumenau-SC, Brazil

18 <sup>5</sup> Autonomous biologist, Blumenau-SC, Brazil

19 <sup>6</sup>Department of Public Health, School of Medical Sciences, State University of Campinas—  
20 UNICAMP, Campinas, Brazil

21 <sup>7</sup> Paulista Agency of Agribusiness Technology, Bauru, São Paulo, Brazil

22

23 \*Corresponding author:

24 Email: [virichini@yahoo.com.br](mailto:virichini@yahoo.com.br) (VBRP)

25

26 ¶¶ These authors contributed equally to this work.

27 &amp; These authors also contributed equally to this work.

28

29 **Key words:** Pathogenic fungi; PCR; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Histoplasma capsulatum*;  
30 *Cryptococcus* spp.; *Aspergillus penicillioides*

31

32 **Abstract**

33 The emergence and reemergence of infectious diseases is propelled by many diverse factors  
34 and the search for pathogens in animal samples may offer opportunity for eco-epidemiologic  
35 studies as well as data on the evolution of pathogens. The objective of this study was to  
36 evaluate the occurrence of pathogenic fungi of public health importance in samples of road-  
37 killed wild animals. A great part of these fungi presented, in common, dimorphism, restricted  
38 geographic distribution and production of conidia infecting, which are aspirated by the host  
39 by means of their respiratory tract. Dogs and armadillos are normally related to the  
40 transmission of *Paracoccidioides brasiliensis*, bats of *Histoplasma* spp., as well as pigeons  
41 feces of *Cryptococcus* spp. We analyzed 1063 samples of organs of 297 wild animals for the  
42 detection of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus* spp.  
43 by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). Universal primers were employed for  
44 the detection of fungi in general and positivity was obtained in 102 samples from 59 animals.  
45 Specific primers were used for the analysis for *P. brasiliensis*, resulting in eight positive  
46 samples from five animals (four *Oxymycterus* spp. and one *Euryoryzomys russatus*). There  
47 was no molecular detection for *Histoplasma* spp. Three samples were identified as  
48 *Cryptococcus* spp. The sequencing was performed, however in 89 samples from 49 animals  
49 was possible to identify *Fungal* sp., two samples for *Cryptococcus neoformans* obtained from

50 *Oxymycterus* spp. and *Akodon* spp.; three samples from *Gracilinanus* spp., *Oxymycterus* spp.  
51 and *Philander* spp. were positive for *Aspergillus penicillioides*. It is important emphasize the  
52 coinfection with *P. brasiliensis* and *Cryptococcus neoformans* in one sample from  
53 *Oxymycterus* spp.. This research shows the importance of wild animals in the transmission of  
54 diseases and the location of the origin of the pathogens in a region that has not been evaluated  
55 yet.

56

### 57 **Author Summary**

58 There are many fungi that are pathogenic and important for cause systemic mycosis in  
59 humans. A great part of these fungi presented in common: dimorphism, restricted geographic  
60 distribution and production of conidia infecting, which are aspirated by the host by means of  
61 their respiratory tract. Many animals are often related with the transmission of some fungi.  
62 The objective of this study was to evaluate the occurrence of pathogenic fungi of importance  
63 for public health in samples of road-killed wild animals. This study supports in the mapping  
64 of pathogen and disease sites in a region that has not yet been evaluated. We analyzed, by  
65 molecular techniques, 1063 samples of organs of 297 wild animals for the detection of fungi  
66 with importance for public health, resulting in 102 samples positive. Therefore, 49 samples  
67 were positive for *Fungal* sp., eight for *Paracoccidioides brasiliensis*, two for *Cryptococcus*  
68 *neoformans*, one for *Cryptococcus* spp. and three for *Aspergillus penicillioides*. The present  
69 results draw attention to a very important source of research and emphasize the importance of  
70 using this biological resource in an epidemiological study of zoonotic infection.

71

### 72 **Introduction**

73 Domestic and wild animals have been pointed out as important in the adaptive evolutionary  
74 process of some species of pathogenic fungi [1] The detection of *Paracoccidioides*

75 *brasiliensis* was related especially in dogs [2-5] and armadillos [6-11]. *Histoplasma* spp. is  
76 commonly associated to the detection in bats [12-16] and *Cryptococcus* spp. is mainly related  
77 too pigeons feces [17,18] and was also isolated in biologic samples of dogs and cats [19,20].  
78 Studies with wild animals are restricted and an alternative for the elucidation of the  
79 epidemiology of diseases of interest in public health is the use of road-killed wild animals. .  
80 Roads and highways are examples of human interventions that by means of natural habitats  
81 rendering their dispersion more difficult. The dead ran over animal and its carcasse left aside  
82 the road is consumed as food by other animals which can also be ran over, increasing the  
83 number of traffic accidents and deaths of wild animals [21,22] Most of the studies with dead  
84 ran over animals are related to the quantitative and qualitative queries of the fauna [23-29]  
85 and helminthologic studies, with the identification of endo and ectoparasites [30-37]. The use  
86 of molecular techniques for the detection of causative agents of zoonosis in samples of road-  
87 killed animals is expanding. Detection of *Mycobaterium bovis* in foxes in Portugal [38], was  
88 possible, although detection of *Mycobacterium leprae* was not [39]. Other studies show  
89 molecular detection for many diverse bacteria and protozoa genders such as *Ehrlichia* spp.  
90 and Hepatozoon spp. [40], *Toxoplasma gondii* [41], *Leishmania* spp. and *Leishmania*  
91 *infantum* (syn. *chagasi*) [42] and fungi such as *Paracoccidioides brasiliensis* [43,44],  
92 *Amauroascus aureus*, *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*,  
93 *Emmonsia parva* and *Pichia stipitis* [45]. Moreover that, the study with wild ran over animals  
94 may offer the development or the perfecting of molecular biology techniques more sensitive  
95 and specific [43,46]. Advances in molecular biology techniques with the characterization of  
96 pathogenic agents are fundamental for the elucidation of molecular epidemiology and species  
97 evolution. Molecular techniques may be employed in the identification and typing of  
98 pathogens, by techniques such as PCR (Polymerase Chain Reaction) employing specific  
99 primers which amplify a fragment of DNA specific of the pathogen, followed by cloning and

100 sequencing [47,48], contributing to a better understanding of epidemiologic and phylogenetic  
101 studies of microorganisms important for public health. Therefore, the study of the major  
102 microorganisms of interest in public health in animal and environmental studies is  
103 fundamental for phenotypic and genotypic diversity, dissemination routes, pathogeny and  
104 improvement of laboratorial diagnosis. It is important to accumulate information of  
105 microorganisms as well as about the host, since this information may also be useful for the  
106 development of drugs and vaccines. The identification of domestic and wild animals infected  
107 by pathogenic fungi is important to evaluate their occurrence in a known region, since they  
108 act as epidemiological markers for the presence of the microorganism, indicating the  
109 existence of sources of infection for humans and animals [49].

110

## 111 **Methods**

### 112 **Animals**

113 In our study, samples were collected from many different species of the following families:  
114 Atelidae, Canidae, Caviidae, Cervidae, Cricetidae, Dasypodidae, Didelphidae, Echimyidae,  
115 Erethizontidae, Felidae, Hydrochaeridae, Leporidae, Marmosidae, Muridae, Mustelidae,  
116 Myocastoridae, Myrmecophagidae, Procyonidae and Sciuridae, representing a total of 1063  
117 samples from 297 road-killed wild animals (Table 1).

118

119

120

121

122

123

124

125 **Table 1:** Distribution of the 297 road-killed wild animals collected for analysis

Family	Species	Number of animals
Atelidae	<i>Alouatta guariba</i>	1
Callitrichidae	NI	1
Canidae	<i>Cerdocyon thous</i>	5
	<i>Cavia aperea</i>	1
Caviidae	<i>Cavia</i> spp.	1
	<i>Hydrochoeus hydrochaeris</i>	2
Cervidae	<i>Mazama</i> spp.	2
	NI	1
	<i>Akodon montensis</i>	6
	<i>Akodon</i> spp.	58
	<i>Brucepattersonius iheringi</i>	3
	<i>Brucepattersonius</i> spp.	3
	<i>Delomys</i> spp.	2
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	4
	<i>Nectomys</i> spp.	6
	<i>Nectomys squamipes</i>	3
Cricetidae	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	1
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	5
	<i>Oligoryzomys</i> spp.	68
	<i>Oxymycterus</i> spp.	12
	<i>Rhagomys</i> spp.	1
	<i>Scapteromys</i> spp.	1
	<i>Sooretamys angouya</i>	3
	<i>Thaptomys nigrita</i>	9
	<i>Thaptomys</i> spp.	2
	NI	7
Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	1
	<i>Euphractus sexcinctus</i>	2
Dasyproctidae	<i>Dasyprocta</i> spp.	1
	<i>Didelphis albiventris</i>	12
	<i>Didelphis aurita</i>	3
	<i>Didelphis</i> spp.	2
	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	2
	<i>Gracilinanus</i> spp.	3
	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	1
Didelphidae	<i>Micoureus paraguayanus</i>	2
	<i>Monodelphis</i> spp.	4
	<i>Philander frenatus</i>	1
	<i>Philander</i> spp.	2
Echimyidae	<i>Euryzygomatomys spinosus</i>	1
	NI	5
Erethizontidae	<i>Sphigurus</i> spp.	1
Felidae	<i>Leopardus wiedii</i>	1

	<i>Puma yagouaroundi</i>	1
Leporidae	NI	2
Marmosidae	<i>Micoureus</i> spp.	1
Muridae	<i>Juliomys pictipes</i>	1
	<i>Nectomys</i> spp.	1
Mustelidae	<i>Galictis cuja</i>	1
	<i>Galictis</i> spp.	1
	<i>Lontra londicaudis</i>	3
Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	1
Myrmecophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i>	5
Procyonidae	<i>Nasua nasua</i>	2
	<i>Procyon cancrivorus</i>	2
Sciuridae	<i>Guerlinguetus aestuans</i>	1
	NI	1
NI (Order Rodentia)	NI	22

126 \*NI (no identification)

127 We collected organs such as skin, liver, heart, spleen and lungs from wild ran over animals in  
 128 roads at the State of Santa Catarina (SC), Brazil. Animals collected presented time of death  
 129 between 1 to 7 hours and were well preserved and had not completely disfigured. The animals  
 130 were put in plastic bags with the proper labels indicating location data, city and sex. Animals  
 131 were necropsied and fragments of the tissues were frozen at – a 70° C. This study was  
 132 approved by the Animal Experiments Ethics Committee of the Adolfo Lutz Intitute (CEUA n°  
 133 02/2015) and by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO n° 50785-  
 134 3). The geographic positions of the road-killed animals, established through GPS (Global  
 135 Positioning System), were plotted on a digital map using a geographic database by ESRI®  
 136 ArcMap™ 10.0, ArcView Licence Type (1999-2010 ESRI Inc), using basemaps available in  
 137 the software.

138

### 139 **Molecular analysis**

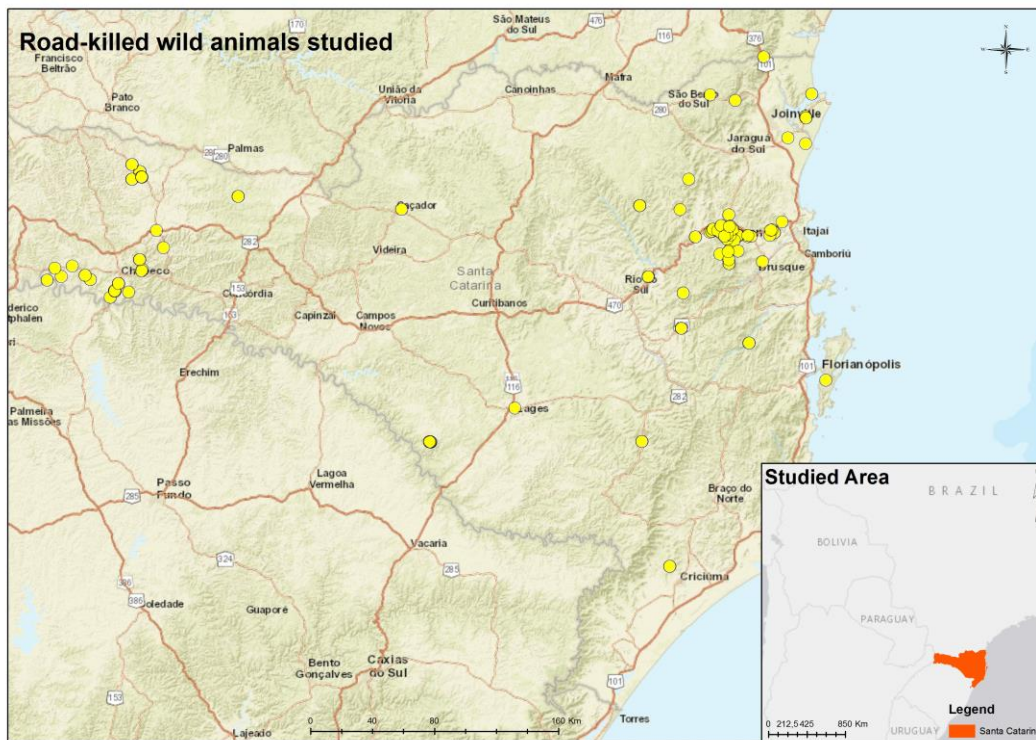
140 Extraction of DNA from tissue samples obtained from the animals was performed employing  
 141 the kit Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare), according to  
 142 instructions from the manufacturer. Quantification was evaluated in spectrophotometer

143 (Epoch-Biotek). DNA amplification for fungi was performed employing the universal primers  
144 ITS4 and ITS5 [50] and for the amplification specific for *Paracoccidioides brasiliensis* was  
145 performed Nested-PCR with primers PbITSE and PbITSR [51]. For the amplification for  
146 *Histoplasma capsulatum* primers ITS1 and ITS4, followed by Nested-PCR with primers HC1  
147 and HC2 [52] and for *Cryptococcus spp.* were employed primers ITS1 and CN4, followed by  
148 Nested-PCR with primers CN5 and CN6 [53]. PCR reactions were performed employing  
149 reaction buffer (20mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl), 1.6mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 0.2μM  
150 each primer, 1 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, USA) and 10ng genomic  
151 DNA. Aliquots of 10μL of each amplified product were added to 2 μL of reaction buffer  
152 (0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol, 30% glicerol, 70% Milli-Q water). After  
153 homogenization, this solution was subjected to horizontal electrophoresis in agarose gel  
154 (1.5%) stained with 0.1μL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®, USA) in a TBE  
155 buffered solution 1X (0.1M Tris, 0.09M boric acid and 0.001M EDTA) (Invitrogen®, USA)  
156 for 60 min at 100V. The bands were visualized under ultraviolet light (296nm), and registered  
157 using the transilluminator (Syngene, USA), and the image was captured by the digital  
158 documentation system. Amplified products were sequenced in the Instituto de Biotecnologia  
159 (IBTEC-Botucatu). Amplicons were visualized in the software Chromas 2.3. Technelysium,  
160 Helensvale, Australia, aligned by the program MEGA7 (54), submitted to BLASTn  
161 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and compared to the sequences deposited in the  
162 databanks.

163

## 164 **Results**

165 Figure 1 illustrates the geographic location of all the road-killed animals evaluated.

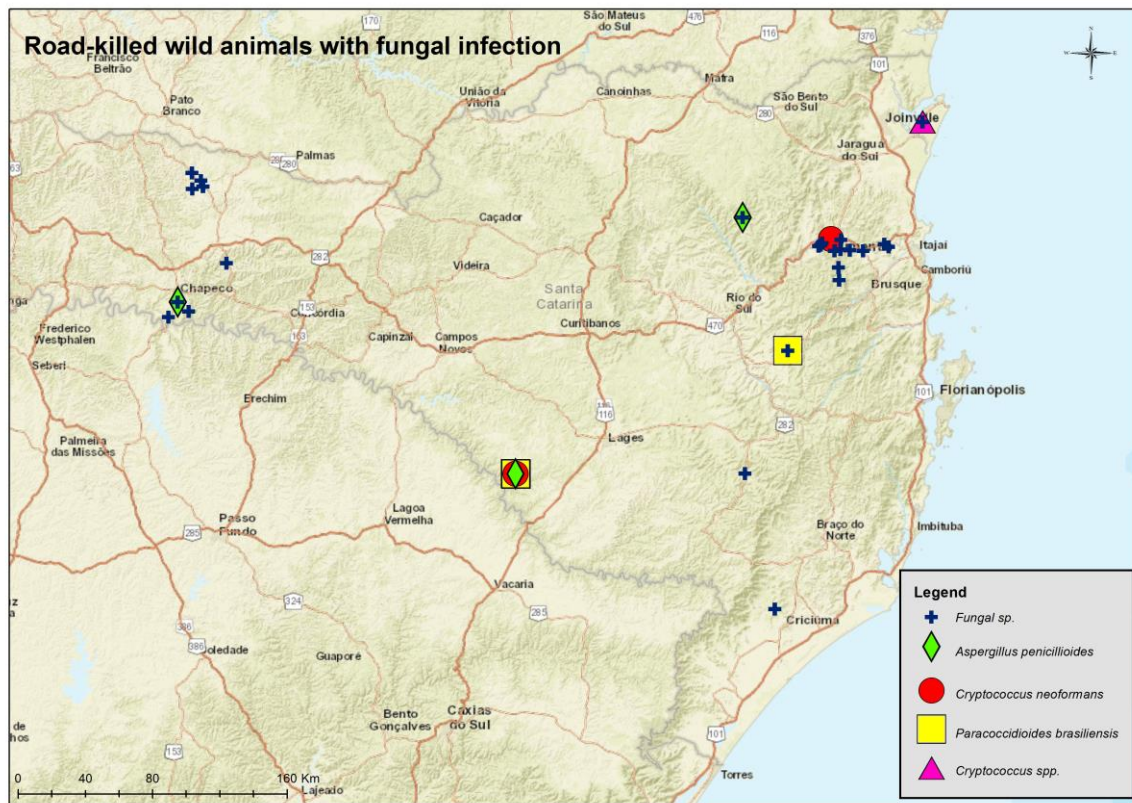


166

167 **Figure 1:** Geographic location of the road-killed animals employed for pathogenic fungi  
 168 molecular detection.

169

170 All the 1063 samples were evaluated by the PCR technique with panfungal primers ITS4 and  
 171 ITS5. The positivity was obtained in 102 samples of 59 animals (Figure 2, Table 2) and  
 172 rodents had the highest positivity for fungi.



173

at

174 **Figure 2:** Geographic location of road-killed animals employed for fungal infection.

175

176 **Table 2:** Distribution of the positive samples at the PCR with ITS4 and ITS5 primers.

Species	Tissue	Animal
<i>Akodon</i> spp.	spleen	A251
	heart	A113, A127, A171, A243
	liver	A150, A171, A243
	lung	A61, A62, A127, A171, A254
<i>Alouatta guariba</i>	lung	A187
	liver	A187
	spleen	A187
	heart	A187
	skin	A187
<i>Brucepattersonius iheringi</i>	lung	A103, A117
	liver	A103
	heart	A103
<i>Brucepattersonius</i> spp.	lung	A176
	liver	A176
	heart	A176
<i>Cerdocyon thous</i>	spleen	A140
	lung	A231

<i>Dasyopus novemcinctus</i>	liver	A56
<i>Delomys</i> spp.	spleen	A188, A189
	heart	A188, A189
	liver	A188
	lung	A188, A189
<i>Didelphis albiventris</i>	liver	A232
	lung	A289
<i>Didelphis aurita</i>	heart	A178
<i>Euryoryzomys russatus</i>	lung	A102
	liver	A102
	heart	A102
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	heart	A179
<i>Gracilinanus</i> spp.	heart	A37
<i>Juliomys pictipes</i>	spleen	A65
<i>Lontra longicaudis</i>	heart	A159
	skin	A159
<i>Nectomys</i> spp.	heart	A257
NI (Family Callitrichidae)	spleen	A229
NI (Family Cervidae)	lung	A260
	liver	A260
	heart	A260
NI (Family Cricetidae)	spleen	A222
	heart	A55, A180
	liver	A180
	lung	A180
NI (Family Echimyidae)	liver	A1
	spleen	A1
NI (Family Sciuridae)	lung	A259
	liver	A259
	spleen	A259
	heart	A259
NI (Order Rodentia)	liver	A63
	lung	A262
	spleen	A262
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	spleen	A118
<i>Oligoryzomys</i> spp.	spleen	A174, A190, A261
	heart	A58, A175, A181, A227, A261, A290
	liver	A38, A181, A226, A261
	skin	A38
	lung	A261, A287
<i>Oxymycterus</i> spp.	spleen	A76, A78, A79
	heart	A73, A78, A82
	liver	A73, A78, A79
	skin	A73, A76, A79

	lung	A73
<i>Philander</i> spp.	lung	A256
	spleen	A258
<i>Sooretamys angouya</i>	spleen	A64
<i>Tamandua tetradactyla</i>	liver	A220
	heart	A220
<i>Thaptomys nigrita</i>	liver	A169
<i>Thaptomys</i> spp.	liver	A149

177

178 In Nested-PCR it was possible to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in 8 samples from 5  
 179 animals (Table 3), three samples positive for *Cryptococcus* spp. (Table 4) and none for  
 180 *Histoplasma capsulatum*.

181

182 **Table 3:** Distribution of the samples evaluated in the Nested-PCR for *P. brasiliensis*

Family	Species	Tissue	Animal
Cricetidae	<i>Oxymycterus</i> spp.	spleen	A76
		heart	A73, A78
		liver	A73, A78, A79
		skin	A73
		lung	A102
	<i>Euryoryzomys russatus</i>		

183

184 **Table 4:** Distribution of the samples evaluated for Nested-PCR for *Cryptococcus* spp.

Family	Species	Tissue	Animal
Cricetidae	<i>Oxymycterus</i> spp.	heart	A78
	<i>Oligoryzomys</i> spp.	liver	A226
	<i>Akodon</i> spp.	liver	A243

185

186 Positive samples for fungi, with no characterization of the researched species, were  
 187 sequenced. The identities of the 89 samples from 49 animals showed 85%- 98% similarity  
 188 with *Fungal* sp. sequence deposited at GenBank (access KT923226.1), two samples which  
 189 showed 98% similarity with *Cryptococcus neoformans* (GenBank KY107218.1) obtained  
 190 from *Oxymycterus* spp. and *Akodon* spp. and three samples which showed 99% similarity with  
 191 *Aspergillus penicillioides* (GenBank KP131612.1 and KP997215.1) obtained from

192 *Gracilinanus* spp., *Oxymycterus* spp. and *Philander* spp.. Is important emphasize the  
193 coinfection with *P. brasiliensis* and *Cryptococcus neoformans* in a sample from *Oxymycterus*  
194 spp..

195

## 196 **Discussion**

197 Wild run over animals in roadsides, even representing a current preservation problem,  
198 represent great potential for eco-epidemiologic studies and molecular detection of  
199 microorganisms represent a viable alternative for the use of animals in research. In the State  
200 of Santa Catarina (SC), Brazil, few quantitative studies exist, the first dating from 2007, in  
201 which 257 mammals were collected from roads BR 116, BR 282 and BR 470 [55] and in  
202 more recent studies 63 specimens were collected from BR 101 [56]. In the year 2014, 66 ran  
203 over mammals were collected in the west of the State [57]. According to the “Departamento  
204 Nacional de Infraestrutura de Transportes” (DNIT), on the road BR-470 in the state of SC, in  
205 a extension of 738,80 km, 133 animals are killed. This road (BR-470) is the second of SC  
206 with the highest number of wild animals ran over [58]. There is a stretch of highway that is  
207 located in the Atlantic Forest and is also bordered by agricultural farms [59] Currently, areas  
208 of the BR-470 are undergoing duplication in the municipalities of Blumenau, Gaspar, Ilhota,  
209 Indaial and Navegantes, and there will be the construction of fauna passages, which are  
210 underground tunnels with the purpose of reducing environmental impacts under the fauna,  
211 minimizing fragmentation of habitats and trampling of wild animals. Beyond the passages of  
212 fauna, it is also thought of the placement of fences that make it difficult for the animal to pass  
213 through the lane or forcing it to pass through the tunnel [60]. In this study, 18 animals were  
214 found died in the BR-470 SC. It was verified that 32% (93/297) of the wild animals were  
215 found ran over near the “Pequenas Centrais Hidrelétricas” (PCHs). These PCHs are built in  
216 areas with a lot of vegetation and with proximity to rivers and water parting, where it is

217 usually the habitat of wild animals. Because of these constructions the animals must leave  
218 their habitat occupied by the buildings, running the risk of being run over [61]. A total of 102  
219 positive samples were obtained from animals such as marsupials, monkeys, bush dogs,  
220 armadillos, squirrels, otter and rodents. Rodents, pertaining to the Rodentia order, were the  
221 group with the highest number of animals collected from roads, probably due to their high  
222 population and the very weak vision, therefore suffering a higher risk of being ran over while  
223 looking for food or shelter [62]. The result not totally conclusive in 89 samples from 49  
224 animals obtained in the sequencing of ITS-5.8S region with universal primers for ITS4/ITS5  
225 fungi, was probably detected because the gene sequence of the species corresponding to the  
226 amplicon has not been deposited in GenBank. In Nested-PCR for *P.brasiliensis* as shown in  
227 Table 2, 8 samples tested positive, from 5 different animals: 4 from the *Oxymycterus* spp.  
228 found in liver, heart, skin and spleen, and one of the *Oryzomys russatus* detected only in  
229 lungs. Both positive species are from rodents and this is confirmed by the literature, showing  
230 the importance of this group of animals as reservoirs of pathogens with zoonotic potential  
231 [63]. In 2015, a study performed in an endemic area for paracoccidioidomycosis (PCM) in  
232 humans, verified, employing PCR, the infection by *P. brasiliensis* in liver and spleen of a  
233 rodent from the species *Oligoryzomys nigripes*. In the same study, other species of rodents  
234 from the species *Akodon* spp., *E. russatus* and *T. nigrita* were positive for PCM in serologic  
235 tests therefore showing that wild animals living in endemic areas for PCM are infected by  
236 *P.brasiliensis* and may be epidemiologic markers for the presence of the fungus in the  
237 environment [64]. For years studies focus on the infection of wild and domestic animals for  
238 *Histoplasma capsulatum* fungus [13,65-67]. In 2014, in a zoo in Bangladesh, animals  
239 infected by *H. capsulatum* were identified [68]. None of the samples analyzed in this study,  
240 so far, were positive for the fungus, since SC is not an endemic region for the disease and the  
241 first report of a microepidemics of Hystoplasmosis in the state occurred in 2006, with two

242 cases and it was possible to isolate the fungus for the first time in SC [69]; however, further  
243 studies are requested in order to understand the epidemiology of this fungus in the State.  
244 Three samples for rodents were positive for *Cryptococcus* spp.: *Oxymycterus* spp. in the  
245 heart, *Oligoryzomys* spp. and *Akodon* spp. in the liver (Tabela 4). That confirms with others  
246 research about the circulation of this fungi in the SC State, where species from *Cryptococcus*  
247 was found in pigeon excreta [70-72) and in humans [73-75]. The sample positive from heart  
248 of the animal *Oxymycterus* spp. was positive for *P. brasiliensis*. Regarding the positive  
249 samples for *Aspergillus penicillioides*, three animals were positive: *Gracillinanus* spp.  
250 (marsupial), *Oxymycterus* spp. (rodent) and *Philander* spp. (marsupial), infected organs such  
251 as heart and spleen. The fungus *Aspergillus* spp. is the agent causing the opportunistic  
252 systemic mycosis Aspergilosis [76]. There are some reports of animals infected by the  
253 fungus, such as penguins [77], dogs [78] and in other wild animals [45]. In the cases of  
254 immunosuppression, the fungus may reach diverse internal organs such as spleen, heart,  
255 bones and eyes [79,80]. Studies identified cardiac aspergilosis by *Aspergillus* spp. in patients  
256 with other diseases [81,82] and regarding *Aspergillus penicillioides*, there is one report of one  
257 case occurring in a three month old child suspected of cystic fibrosis, developing  
258 disseminated aspergilosis and, employing the molecular technique, the fungus *A.*  
259 *penicillioides* was identified [83]. It is important emphasize the coinfection with *P.*  
260 *brasiliensis* and *Cryptococcus neoformans* in a sample from *Oxymycterus* spp.. The present  
261 results show the problem of the large number of wild animals killed in our highways,  
262 emphasizing the relevance of using this biological resource in eco-epidemiological studies of  
263 fungal pathogens.  
264

## References

1. Rippon JW. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 3th. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988.
2. Ricci G, Mota, FT, Wakamatsu, A, Serafim, RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2004; 42(4):379-383.
3. Farias MR, Condas LAZ, Ribeiro MG, et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: Case report of generalized lymphadenomegaly. Mycopathol. 2011;172:147-152.
4. Corte AC, Gennari SM, Labruna MB, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. Pesq Vet Bras. 2012;32(7):649-652.
5. Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. Mycopathol. 2016:1-10.
6. Corredor GG, Casta-O JH, Peralta LA, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. Rev Iberoam Micol. 1999;16:216-220.
7. Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. Med Mycol. 2005; 43:275-280.
8. Macedo R, Lacera M, Trilles Reis R. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: Estudo preliminar. Anais do II Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro. 1998. Abstract 182.
9. Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. Med. Mycol. 2000;38:67-77.
10. Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZPD, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. Med Mycol, 2000; 38(3):193-199.

11. Bagagli E, Franco M, Bosco SDM, Hebelers-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol*, 2003;41(3): 217-223.
12. Schmidt S, Machado OP, Galvão AB. Microepidemia de histoplasmose em zona rural de Brasília-DF. II Estudo epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1973;7:107-115.
13. Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no município do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública*. 1986;2(1):42-52.
14. Suzaki A, Kimura M, Kimura S, Shimada K, Miyaji M, Kaufman L. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. *Kansenshogaku zasshi*. 1995;69(4): 444-449.
15. Jülg B, Elias J, Zahn A, Köppen S, Becker-Gaab C, Bogner JR. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. *J Travel Med*. 2008;15(2): 133-6.
16. González-González AE, Aliouat-Denis CM, Ramírez-Bárcenas JA, et al. *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis* spp. co-infection in wild bats from Argentina, French Guyana, and Mexico. *BMC microbiology*. 2014;14(1):1.
17. Garcia J, Shea J, Alvarez-Vasquez F, et al. Mathematical modeling of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Syst. Bio*. 2008; 4(1):183.
18. Menezes T, Scain G, de Quadros RM, et al. *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos (*Columba livia*) de áreas públicas de Lages, Santa Catarina. *Science Animal Health*. 2014;2(2): 102-114.
19. Byrnes EJ, Bildfell RJ, Dearing PL, Valentine BA, Heitman J. *Cryptococcus gattii* with bimorphic colony types in a dog in western Oregon: additional evidence for

- expansion of the Vancouver Island outbreak. *J Vet Diagn Invest.* 2009; 21(1): 133-136.
20. Araújo Júnior EC, Táparo CV, Uchida CY, Marinho M. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2015;67(4): 1003-1008.
21. Lima SF, Obara AT. Levantamento de animais silvestres atropelados na BR-277 às margens do Parque Nacional do Iguaçu: subsídios ao programa multidisciplinar de proteção à fauna. VII Semana de Artes da Universidade Estadual de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 2004.
22. Turci LCB, Bernarde PS. Vertebrados atropelados na rodovia estadual 383 em Rondônia, Brasil. *Biotemas.* 2009;22(1): 121-127.
23. Vieira EM. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Cien Cult* 1996; 48: 270-272.
24. Cândido Jr JF, Margarido VP, Pegoraro JL, et al. Animais atropelados na rodovia que margeia o Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil, e seu aproveitamento para estudos da biologia da conservação. *Anais do III Brasileiro de Unidades de Conservação*, Fortaleza. 2002. P:553-562.
25. Rodrigues FHG, Hass A, Rezende LM, et al. Impacto de rodovias sobre a fauna da Estação Ecológica de Água Emendadas, DF. In: *Anais do III Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação*, Fortaleza. 2002. P:585
26. Prada CDS. Atropelamento de vertebrados silvestres em uma região fragmentada do nordeste do estado de São Paulo: quantificação do impacto e análise de fatores envolvidos [Doutorado]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2004.
27. Pinowski, J. Roadkills of vertebrates in Venezuela. *Rev Bras Zool* 2005; 22(1): 191-196.

28. Cáceres NC, Casella J, Goulart CS. Variação espacial e sazonal de atropelamentos de mamíferos no bioma cerrado, rodovia BR 262, Sudoeste do Brasil. *Mastozool Neotrop.* 2012;19(1): 21-33.
29. Hegel CGZ. Mamíferos silvestres atropelados na rodovia RS-135 e entorno. *Biotemas.* 2012;25(2): 165-170.
30. Cheadle MA, Tanhauser SM, Dame JB, et al. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *Int J Parasitol.* 2001;31(4): 330-335.
31. Nelder MP, Reeves WK. Ectoparasites of road-killed vertebrates in northwestern South Carolina, USA. *Vet Parasitol.* 2005;129(3):313-322.
32. Griese, J. Helmintofauna de vertebrados atropelados em rodovias da região de Botucatu, São Paulo [Dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências; 2007.
33. Ferroglio E, Ragagli C, Trisciuglio A. *Physaloptera sibirica* in foxes and badgers from the Western Alps (Italy). *Vet Parasitol.* 2009;163(1): 164-166.
34. Hoppe EGL, Araújo de Lima, RC, Tebaldi JH, Athayde ACR, Nascimento AAD. Helminthological records of six-banded armadillos *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) from the Brazilian semi-arid region, Patos county, Paraíba state, including new morphological data on *Trichohelix tuberculata* (Parona and Stossich, 1901) Ortlepp, 1922 and proposal of *Hadrostrongylus ransomi* nov. comb. *Braz J Biol.* 2009; 69(2): 423-428.
35. Miquel J, Foronda P, Torres J, Swiderski Z, Feliu C. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), an intestinal parasite of *Felis catus* from La Palma (Canary Islands, Spain) *Parasitol Res.* 2009;104(6):1477–1483.

36. Sepulveda MS, Kinsella JM. Helminth collection and identification from wildlife. *JoVE*. 2013;82.
37. Al-Sabi, MNS, Halasa T, Kapel CMO. Infections with cardiopulmonary and intestinal helminths and sarcoptic mange in red foxes from two different localities in Denmark. *Acta Parasitologica*. 2014;59(1): 98-107.
38. Matos AC, Figueira L, Santos M, et al. Prevalência da infecção de *Mycobacterium bovis* em quatro famílias de carnívoros selvagens em Portugal. VI Jornadas Nacionais de Genética e Biotecnologia. 2014.
39. Pedrini SCB, Rosa PS, Medri ÍM, Mourão G, Bagagli E, Lopes CADM. Search for *Mycobacterium leprae* in wild mammals. *Braz J. Infect. Dis*. 2010; 14(1): 47-53.
40. Almeida AP, Souza TD, Marcili A, Labruna MB. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *J Med Entomol*. 2013;50(3): 640-646.
41. Richini-Pereira VB, Marson PM, Silva RCD, Langoni H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(5): 602-607.
42. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2014;20(1): 1
43. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griese J, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 2008;46(1):35–40.

44. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, et al. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. BMC Res Notes. 2009;2:1–6.
45. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Barrozo L, Bagagli E. Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010;16(4): 607-613.
46. Zhao C, Onuma M, Asakawa M, Nagamine T, Kuwana T. Preliminary studies on developing a nested PCR assay for molecular diagnosis and identification of nematode (*Heterakis isolonche*) and trematode (*Glaphyrostomum* sp.) in Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*). Vet Parasitol. 2009;163: 156-60.
47. Bowman BH. A model PCR/probe system for the identification of fungal pathogens. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. American Society Microbiology. 1993: 423-430.
48. Chen BY, Janes HW. PCR cloning protocols. Ed: Springer Science & Business Media; 2002; V:192.
49. Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, Varela E. First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*. Rev. Argent. Microbiol. 2004; 37(1): 46-56.
50. White TM, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–321.
51. Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. Med Mycol. 2005;43(8): 725-729.
52. Reid TM, Schafer MP. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil

- suspensions by two-stage PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 1999;13(4): 269-273,.
53. Rappelli P, Are R, Casu G, et al. Development of a Nested PCR for Detection of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(11): 3438-3440.
54. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, msw054. 2016
55. Cherem JJ, Kammers M, Ghizoni-Jr IR, Martins A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas*. 2007; 20(3): 81-96.
56. Souza Costa L. Survey of wild mammals small and medium-size run over in BR-101, stretch between the municipalities. *Biosci J*. 2011;27(4).
57. Orlandin E, Piovesan M, Favretto MA, D'Agostini FM. Mamíferos de médio e grande porte atropelados no Oeste de Santa Catarina, Brasil. *Biota Amazônia*. 2015;5(4): 125-130.
58. DNIT INFORMA- Informativo do Departamento Nacional de Infraestrutura e Transportes: Atropelamento de animais silvestres: monitoramento para redução de perdas. [cited 2017 Jan 31] Available from: <http://www.dnit.gov.br/download/CGMAB.pdf>
59. Rezini JA. Atropelamento de mamíferos em rodovias do Leste dos Estados do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil. [dissertation]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
60. GESTÃO AMBIENTAL: Você sabia? Nos quatro lotes dos municípios pertencentes a obra de duplicação da rodovia BR-470/SC serão construídos 31 passagens de fauna. Você imagina por quê? [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://gestaoambientalbr470.com.br/2016/11/voce-sabia-nos-quatro-lotes-dos->

- municipios-de-navegantes-ilhota-gaspar-blumenau-e-indaial-pertencentes-a-obra-de-duplicacao-da-rodovia-br-470sc-serao-construidos-31-passagens-de-fauna-voce-ima/
61. Borges JF. Análise da construção de PCHS no Alto Vale do rio Tijucas/ SC. [dissertation]. Florianópolis: Universidade do estado de Santa Catarina; 2011.
  62. Hanson Anne. Rat behavior and biology. Anne's rat page, California, disponible en: <http://ratbehavior.org/RatVision.htm> acesso em: 29 novembro 2016.
  63. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ed. Washington: OPS/WHO Publicación Científica. 1986;(503).
  64. Sbeghen MR, Zanata TB, Macagnan R, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in small wild mammals. Rev Mycopat. 2015; 180: 435–440.
  65. Emmons CW. Histoplasmosis: animal reservoirs and other sources in nature of the pathogenic fungus, *Histoplasma*. Am J Publ Health. 1950; 40: 436-40.
  66. Menges RW, Furcolow ML, Habermann RT, Weeks RJ. Epidemiologic studies on histoplasmosis in wildlife. Environm Res. 1967;1(2): 129-144.
  67. Naiff RD, Mok WY, Naiff MF. Distribution of *Histoplasma capsulatum* in Amazonian wildlife. Mycopathologia. 1985; 89(3): 165-168.
  68. Ahasan SA, Chowdhury EH, Khan MAH, et al. Histopathological identification of histoplasmosis in animals at Dhaka Zoo. Bangl J Vet Med. 2014;11(2): 177-181.
  69. Oliveira FDM, Unis G, Severo LC. Microepidemia de histoplasmosse em Blumenau, Santa Catarina. J Bras Pneumol. 2006; 32(4): 375-378.
  70. Garcia LC. Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina [dissertation] Florianópolis: Centro de Ciências Biológicas; 2008.
  71. Schneider REG, Güez CM, Stefanello B, Fuentefria AM. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos nos locais públicos na cidade de Chapecó, Santa

- Catarina. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal do Pampa, Bagé – Rio Grande do Sul, Brasil; 2009; 1(1).
72. Menezes T, Scain G, de Quadros RM, Miletto LC, Souza AL, de Lima Miguel R, Marques SMT. *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos (*Columba livia*) de áreas públicas de Lages, Santa Catarina. *Science and Animal Health*, 2014; 2(2): 102-114.
73. Cavalcanti MB. Criptococose pulmonar-relato de caso [dissertation]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 1999.
74. Dambrós BP. Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa Catarina [dissertation]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.
75. Gomes NT, da Silva RM. Pneumopatias em pacientes com HIV/Aids: estudo de 118 casos em um hospital de referência. *Pulmão RJ*, 2008; 17(2-4): 62-69.
76. Klein DL, Gamsu G. Thoracic manifestations of aspergillosis. *AJR Am J Roentgenol*. 1980; 134:543–552.
77. Xavier MO, Leite ATM, Soares MP, et al. Aspergilose em Pingüim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) Relato de Caso. 2006.
78. Sanches PP, Coutinho SDA. Aspergilose em cães-revisão. *J Health Sci Inst* 2007;25(4).
79. Smith SA, Andrews G, Biller DS. Management of nasal aspergillosis in a dog with a single, noninvasive intranasal infusion of clotrimazole. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1998;34(6):487-92.
80. Harkin KR. Aspergillosis an overview in dogs and cats. *Vet Med*. 2003; 98(7):602-18.
81. Soares RR, Albergaria VF, Lorentz MN, Valadares FW. Anestesia para tratamento de aspergilose cardíaca em paciente com trombocitopenia: o uso criterioso da Aprotinina. *Rev Bras Anesthesiol*. 2007;57(6): 672-677.

82. Vrandecic BAL, Nobre ALCS, Dias DL. Ecocardiograma na investigação e acompanhamento de paciente neutropênico febril com diagnóstico de aspergilose cardíaca. Rev Bras. Ecocardiogr Imagem Cardiovasc. 2011; 24(4): 77-79.
83. Gupta K, Gupta P, Mathew JL, et al. Fatal disseminated *Aspergillus penicillioides* infection in a three-month-old infant with suspected cystic fibrosis: autopsy case with review of literature. Ped Develop Pathol. 2015.

265 **Conclusão**

266

267 Os animais silvestres mortos por atropelamento são importantes sinalizadores da  
268 presença de diversos fungos na natureza;

269

270 A detecção molecular de *P. brasiliensis* em animais silvestres em uma área não  
271 avaliada confirma a presença deste patógeno no Estado de Santa Catarina;

272

273 No Estado de Santa Catarina, a detecção molecular de *Cryptococcus neoformans* em  
274 roedores demonstra a expansão do fungo para um novo grupo de animais;

275

276 A utilização do sistema de informação geográfica é uma ferramenta útil para a  
277 caracterização ambiental das áreas de ocorrência de fungos, principalmente as espécies  
278 detectadas: *P. brasiliensis*; *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus penicillioides*;

279

280 A coinfeção de *P. brasiliensis* e *C. neoformans* em roedores demonstra a importância  
281 deste grupo animal no processo evolutivo adaptativo de algumas espécies de fungos  
282 patogênicos;

283

284 A detecção molecular inédita de *A. penicillioides* em marsupiais e roedores indica a  
285 distribuição deste patógeno em animais silvestres;

286

287 A utilização de ferramentas moleculares sensíveis e específicas são úteis para estudos  
288 epidemiológicos de detecção de fungos patogênicos em amostras de tecido de animais.

289

## Anexos

## Anexo 1: Autorização CEUA



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CEUA-IAL



## ANEXO E

São Paulo, 13 de novembro de 2015.

Protocolo 02 / 2015

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Deteção e quantificação molecular de micro-organismos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento**”, sob a responsabilidade de **Virginia Bodelão Richini Pereira**, Pesquisador Científico do Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratórios Regionais II de Bauru do Instituto Adolfo Lutz, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL).

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	19/11/2015 a 19/11/2018
Espécie/linhagem	Animais silvestres mortos por atropelamento
Nº de animais	297
Peso/Idade	não se aplica
Sexo	machos e fêmeas
Origem	Vários Municípios do Estado de Santa Catarina

Atenciosamente,

Raquel dos Anjos Fazioli  
Coordenadora da CEUA-IAL

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102  
Pacaembu - São Paulo – SP – CEP: 01246-000  
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

## Anexo 2: Autorização SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

Número: 50785-3



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: 50785-3	Data da Emissão: 06/09/2016 08:42	Data para Revalidação*: 06/10/2017
* 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: Virginia Bodelão Richini Pereira	CPF: 267.920.678-90
Título do Projeto: Detecção e quantificação molecular de micro-organismos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento	
Nome da Instituição: INSTITUTO ADOLFO LUTZ	CNPJ: 46.374.500/0045-05

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Avaliação molecular de amostras de animais silvestres mortos.	10/2015	10/2017

#### Observações e ressalvas

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

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BLUMENAU	SC	Municípios de Santa Catarina	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Cingulata, Canidae, Rodentia, Felidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae, Didelphimorphia, Mustelidae, Procyonidae, Lagomorpha

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
---	----------------------------------	--

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

Código de autenticação: 41672646





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: 50785-3	Data da Emissão: 06/09/2016 08:42	Data para Revalidação*: 06/10/2017
* 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: Virginia Bodelão Richini Pereira	CPF: 267.920.678-90
Título do Projeto: Detecção e quantificação molecular de micro-organismos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento	
Nome da Instituição : INSTITUTO ADOLFO LUTZ	CNPJ: 46.374.500/0045-05

2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
3	Amostras biológicas (Primates)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
4	Amostras biológicas (Tatus)	Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
5	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta( apenas coleta de animais mortos por atropelamento )
6	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta( apenas animais mortos por atropelamento ou mortos em zoológico)
7	Método de captura/coleta (Primates)	Outros métodos de captura/coleta( apenas coleta de animal morto por atropelamento)
8	Método de captura/coleta (Tatus)	Captura manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Regional de Blumenau	

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

**Código de autenticação: 41672646**



Página 2/4



**Anexo 3:** Lista dos primers consolidados na literatura a serem testados nas reações de PCR e Nested-PCR, indicando o micro-organismo, a quantidade de pares de bases, a sequência e o perfil de ciclagem

Micro-organismo	Amplicon	primers	sequência	perfil de ciclagem
Fungos em geral	634pb	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	25X { 94°C-5min 94°C-1min 60°C-2min 72°C-2min 72°C-7min
		ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3'	
<i>Histoplasma capsulatum</i>	600pb	ITS1	5'- TCCGTAGTAACCTGCGG -3'	30X { 95°C-5min 95°C-50s 50°C-50s 72°C-50s 72°C-5min
		ITS4	5'- TCCTCCGCTATTGATATGC-3'	
	400pb	HC1	5'- GGAGCCTCTGACCGGGAC -3'	40X { 95°C-5min 94°C-1min 60°C-1min 72°C-1min 72°C-5min
		HC2	5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'	
<i>Cryptococcus spp</i>	415pb	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	30x { 94°C – 5 min 94°C – 1 min 62°C – 1 min 72°C – 2 min 72°C–10 min
		CN4	5'- ATCACCTTCCCACTAACACATT -3'	
	115pb	CN5	5'- GAAGGGCATGCCTGTTTGAGAG-3'	35x { 94°C – 5 min 94°C – 1 min 61°C – 1 min 72°C – 2 min 72°C–10 min
		CN6	5'- TTTAAGGCGAGCCGACGTCCTT -3'	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Nested-PCR 387pb	PbITSE	5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3'	30X { 94°C-5min 94°C-1min 62°C-2min 72°C-2min 72°C-10min
		PbITSR	5'-AAGGGTGTTCGATCGAGAGAG-3'	

**Anexo 4:** Protocolo de Extração de DNA em amostras de tecido utilizando kit de extração:

**Ilustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE)**

- Ligar fluxo 30 minutos na luz UV
- Masserar a amostra e passar no Biospec
- Em um tubo de 1,5 ml colocar 400 µl de tampão de extração 2 e colocar uma pequena quantidade de tecido macerado
- Deixar 15 minutos no agitador
- Centrifugar 3.000 G (de 30 s à 1 minuto)
- Retirar sobrenadante com pipeta e colocar novos micro-tubos de 1,5
- Adicionar 10µl de proteinase K (20mg/ml) + 50 µl de solução de lise 1
- Vórtex 15 segundos
- Incubar temperatura ambiente 10 min
- Colocar coluna no tubo coletor e aplicar toda a amostra na coluna
- Centrifugar 11000 G por 1 minuto
- Descartar o sobrenadante
- Adicionar 500 µl da solução de lise 2
- Centrifugar 11000 G por 1 minuto
- Descartar o líquido centrifugado
- Adicionar 500 µl de tampão de lavagem
- Centrifugar 11000 G por 3 minutos
- Descartar tubo coletor e colocar o filtro em novo microtubo de 1,5 ml
- Adicionar 100 µl de tampão de eluição à 70°C
- Incubar 1 minuto em temperatura ambiente
- Centrifugar 11000 G por 1 minuto

## Anexo 5: Submissão do artigo

**PLOS Neglected Tropical Diseases**  
**Molecular detection of important fungi for public health in wild animals**  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Molecular detection of important fungi for public health in wild animals
Short Title:	Pathogenic fungi in wild animals
Article Type:	Research Article
Keywords:	Pathogenic fungi; PCR; Paracoccidioides brasiliensis; Histoplasma capsulatum; Cryptococcus spp.; Aspergillus penicillioides
Corresponding Author:	Virgínia Bodelão Richini-Pereira Adolfo Lutz Institute Bauru, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Adolfo Lutz Institute
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Débora de Oliveira Losnak
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Débora de Oliveira Losnak Francielle Ramalho Rocha Barbara Soares de Almeida Keila Batista Sérgio Althoff Josiane Haupt Luciana da Silva Ruiz Laís Anversa Laís Moraes Paiz Simone Baldini Lucheis Virgínia Bodelão Richini-Pereira
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The emergence and reemergence of infectious diseases is propelled by many diverse factors and the search for pathogens in animal samples may offer opportunity for eco-epidemiologic studies as well as data on the evolution of pathogens. The objective of this study was to evaluate in samples of road-killed wild animals the occurrence of pathogenic fungi of importance for public health. A great part of these fungi presented, in common, dimorphism, restricted geographic distribution and production of conidia infecting, which are aspirated by the host by means of their respiratory tract. Dogs and armadillos are normally related to the transmission of Paracoccidioides brasiliensis, bats to Histoplasma spp., as well as pigeons feces to Cryptococcus spp.. We analyzed 1063 samples of organs of 297 wild animals for the detection of Paracoccidioides brasiliensis, Histoplasma capsulatum and Cryptococcus spp. by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). Universal primers were employed for the detection of fungi in general and positivity was obtained in 102 samples from 59 animals. For the P. brasiliensis analysis was used specific primers, resulting in eight positive samples from five animals (four Oxymycterus spp. and one Euryoryzomys russatus). There was no molecular detection to Histoplasma spp.. Was possible the identification of three

## Anexo 6: Currículo Lattes

### Debora de Oliveira Losnak

Curriculum Vitae

---

#### Formação acadêmica/titulação

**2011 - 2014**      Graduação em Biomedicina.  
Faculdades Integradas de Bauru, FIB, Bauru, Brasil  
Título: Estudo Sorológico de Leishmaniose Visceral Canina em Amostras Enviadas ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II - Bauru - São Paulo  
Orientador: Priscila Raquel Martins

---

#### Formação complementar

**2015 - 2015**      Curso de curta duração em Biologia Molecular de Fungos. (Carga horária: 8h).  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

**2015 - 2015**      Curso de curta duração em ABNT NBR ISO/IEC 17025. (Carga horária: 9h).  
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

**2015 - 2015**      Curso de curta duração em ABNT NBR NM ISO 15189:2008. (Carga horária: 9h).  
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

**2013 - 2015**      Course of English: Start, Vision, Control and Speed Up. . (Carga horária: 160h).  
The Place English School, TPES, Brasil

**2014 - 2014**      Curso de curta duração em Como elaborar um POP. (Carga horária: 2h).  
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

**2014 - 2014**      Curso de curta duração em Requisitos da Qualidade. (Carga horária: 2h).  
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

**2013 - 2013**      Curso de curta duração em Treinamento de POPS de Biossegurança. (Carga horária: 2h).  
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

**2013 - 2013**      Curso de curta duração em Minicurso Células Tronco. (Carga horária: 4h).  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

**2012 - 2012**      Curso de curta duração em Bioquímica Básica e Clínica. (Carga horária: 4h).  
Faculdades Integradas de Bauru, FIB, Bauru, Brasil

**2009 - 2011**      Informática DOT NET. . (Carga horária: 273h).  
Microcamp, MC, Brasil

**2011 - 2011**      Curso de curta duração em Minicurso Síndromes Genéticas e Aconselhamento.  
(Carga horária: 5h).  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

---

#### Atuação profissional

##### 1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

---

###### Vínculo institucional

**2015 - Atual**      Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de Mestrado ,

Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

## 2. Instituto Lauro de Souza Lima - ILSL

---

### Vínculo institucional

**2016 - 2016** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 40, Regime: Integral

---

### Atividades

**08/2016 - 09/2016** Estágio, Instituto Lauro de Souza Lima  
*Estágio na Área de Biologia Molecular*

## 3. Instituto Adolfo Lutz - IAL

---

### Vínculo institucional

**2015 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

**2013 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica , Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva

---

### Atividades

**11/2016 - 11/2016** Outra atividade técnico-científica, Centro de Laboratórios de Bauru  
*Especificação:  
Ouvinte no Seminário de Ciência e Tecnologia e Inovação do IAL, Palestra: Noções de Propriedade Industrial, Patentes e outras formas de proteção*

**09/2016 - 09/2016** Estágio, Centro de Laboratórios de Bauru  
*Estágio:  
Laboratório de Micologia*

**04/2016 - 04/2016** Outra atividade técnico-científica, Centro de Laboratórios de Bauru  
*Especificação:  
Ouvinte no Seminário em Ciência, Tecnologia e Inovação do IAL*

**03/2015 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Laboratórios de Bauru  
*Linhas de pesquisa:  
Detecção molecular de fungos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.*

**07/2013 - 12/2014** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Laboratórios de Bauru  
*Linhas de pesquisa:  
Avaliação sorológica de Leishmania em amostras provenientes de cães e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo.*

## 4. Faculdades Integradas de Bauru - FIB

---

### Vínculo institucional

**2012 - 2012** Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitora , Carga horária: 12, Regime: Parcial

**2011 - 2014** Vínculo: Aluno de Graduação , Enquadramento funcional: Aluno , Carga horária: 20, Regime: Parcial

---

### Atividades

**01/2014 - 12/2014** Estágio, Faculdades Integradas de Bauru

*Estágio:  
Estágio Supervisionado de Conclusão de Curso*

**07/2013 - 07/2013** Estágio, Faculdades Integradas de Bauru

*Estágio:  
Estágio de Observação Extra Curricular em Parasitologia Clínica*

---

## Linhas de pesquisa

1. Avaliação sorológica de Leishmania em amostras provenientes de cães e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo.
2. Detecção molecular de fungos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.

---

## Projetos

Projetos de pesquisa

**2015 - Atual** Detecção molecular de fungos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Debora de Oliveira Losnak; Virgínia Bodelão Richini-Pereira (Responsável)

**2013 - 2014** Avaliação sorológica de Leishmania em amostras provenientes de cães e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3);

Integrantes: Debora de Oliveira Losnak; Cassio de Oliveira; BARBARA SUARES DE ALMEIDA; Virgínia Bodelão Richini-Pereira (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

---

## Áreas de atuação

1. Epidemiologia
2. Imunologia
3. Análises Clínicas
4. Biologia Molecular

---

## Idiomas

**Inglês** Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem

**Espanhol** Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

---

## Prêmios e títulos

**2015** 2º Lugar na sessão de apresentação oral da área 1 do I Encontro Encontro Nacional entre os Programas de Pós-Graduação de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

**2014** 2º Lugar na sessão de pôster da área 1 (Iniciação Científica, Aprimoramento, Especialização e Outros) do VIII Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de

## Produção

### Produção bibliográfica

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. RUIZ, L. S.; MELO, M. B. A.; PAULA, C. R.; MELHEM, M. S. C.; SZESZS, M. W.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; AULER, M. E.; **LOSNAK, D.O.**; SIMOES, C. C. N.; ARNONI, M. V. INFECÇÕES CAUSADAS POR ESPÉCIES DE FUSARIUM EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM CÂNCER In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 2016, Florianópolis. **Resumos VIII Congresso Brasileiro de Micologia.** , 2016.

2. ROCHA, F. R.; **LOSNAK, D.O.**; BATISTA, K. Z. S.; ALTHOFF, S. L.; HAUPT, J.; RUIZ, L. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B. MOLECULAR DETECTION OF FUNGI IN ROAD-KILLED RODENTS FROM THE SANTA CATARINA STATE, BRAZIL In: IX Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2016, Botucatu. **IX Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu.** , 2016.

3. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; SILVA, L. R.; HILOMI, H. T.; MITSUYOSHI, R. H.; TOLEZANO, J. E.; LUCHEIS, S. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B. ANÁLISE DOS TESTES SOROLÓGICOS DE AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS DA REGIÃO DE BAURU-SP ENVIADOS AO INSTITUTO ADOLFO LUTZ - CLR II - PARA CONFIRMAÇÃO DE LEISHMANIOSES HUMANA VISCERAL E CUTÂNEA In: 18º Encontro Nacional de Biomedicina, 2015, Botucatu. **18º Encontro Nacional de Biomedicina.** , 2015.

4. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; SILVA, L. R.; NOBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B. ATIVIDADES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE SOBRE LEISHMANIOSE EM UM ESCOLA MUNICIPAL NA CIDADE DE BAURU-SÃO PAULO In: 1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical, 2015, Botucatu. **1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical.** , 2015.

5. **LOSNAK, D.O.**; MARQUES, M. J. G.; GARCIA, M. Z.; SILVA, L. R.; RICHINI-PEREIRA, V. B. AVALIAÇÃO DA POSITIVIDADE DE MARCADORES SOROLÓGICOS PARA HEPATITE B EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES DE BAURU E REGIÃO ENVIADAS AO INSTITUTO ADOLFO LUTZ – CLR – II – BAURU, SP In: 18º Encontro Nacional de Biomedicina, 2015, Botucatu. **18º Encontro Nacional de Biomedicina.** , 2015.

6. ALMEIDA, B. S.; OLIVEIRA, C; **LOSNAK, D.O.**; LUCHEIS, S. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B. AVALIAÇÃO MOLECULAR DE LEISHMANIA EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE CÃES E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA NA REGIÃO DE BAURU, SÃO PAULO In: 1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical, 2015, Botucatu. **1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical.** , 2015.

7. FIGUEIREDO, K. M.; **LOSNAK, D.O.**; ALMEIDA, B. S.; SILVA, L. R.; MARQUES, M. J. G.; GARCIA, M. Z.; RICHINI-PEREIRA, V. B. DIAGNÓSTICO DE DENGUE EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO DE BAURU - SP, ANO DE 2013 In: 1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical, 2015, Botucatu. **1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical.** , 2015.

8. FIGUEIREDO, K. M.; **LOSNAK, D.O.**; ALMEIDA, B. S.; SILVA, L. R.; MARQUES, M. J. G.; GARCIA, M. Z.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
DIAGNÓSTICO DE DENGUE EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO DE BAURU - SP, ANO DE 2014. In: 18º Encontro Nacional de Biomedicina, 2015, Botucatu.  
**18º Encontro Nacional de Biomedicina.** , 2015.
9. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; SILVA, L. R.; HILOMI, H. T.; MITSUYOSHI, R. H.; TOLEZANO, J. E.; LUCHEIS, S. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
POSITIVIDADE DE LEISHMANIOSE HUMANA EM EXAME DIRETO DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA ENVIADOS AO INSTITUTO ADOLFO LUTZ - CLR II - BAURU, SP In: 1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical, 2015, Botucatu.  
**1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais/Medicina Tropical.** , 2015.
10. RICHINI-PEREIRA, V. B.; **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; RUIZ, L. S.; HILOMI, H. T.; MITSUYOSHI, R. H.; TOLEZANO, J. E.; LUCHEIS, S. B.  
AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE LEISHMANIA PELOS TESTES DE ELISA E TR-DPP® EM AMOSTRAS DE CÃES DE INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO PROVENIENTES DE MUNICÍPIOS DA REGIÃO DE BAURU, SÃO PAULO. In: XXX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2014, Uberaba.  
**XXX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses.** , 2014.
11. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; HILOMI, H. T.; MITSUYOSHI, R. H.; TOLEZANO, J. E.; SILVA, L. R.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
Evaluation of Chromatographic Immunoassay for the Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in the Region of Bauru In: VIII Encontro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2014, Botucatu.  
**VIII Encontro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu.** , 2014.
12. OLIVEIRA, C; **LOSNAK, D.O.**; ALMEIDA, B. S.; SILVA, L. R.; PAVANELLI, A.; NOBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
Health Educational Activities on Leishmaniasis for Healthcare Agents Jaú-SP, Brazil In: VIII Encontro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2014, Botucatu.  
**VIII Encontro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu.** , 2014.
13. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; MARQUES, M. J. G.; GARCIA, M. Z.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
Diagnóstico de Dengue em municípios da região de Bauru - SP, no ano de 2012 In: 16º Encontro Nacional de Biomedicina, 2013, Botucatu.  
**16º Encontro Nacional de Biomedicina.** , 2013.
14. OLIVEIRA, C; **LOSNAK, D.O.**; GARCIA, M. Z.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
Diagnóstico de Sífilis em pacientes encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II- Bauru In: 16º Encontro Nacional de Biomedicina, 2013, Botucatu.  
**16º Encontro Nacional de Biomedicina.** , 2013.
15. BERGAMO, V. F.; **LOSNAK, D.O.**; RETT, M. S.; QUERINO, G. A.  
Epidemiologia, Aspectos Clínicos e Prevenção da Gonorreia In: VIII Jornada Científica das Faculdades Integradas de Bauru, 2013, Bauru.  
**VIII Jornada Científica das Faculdades Integradas de Bauru.** , 2013.
16. **LOSNAK, D.O.**; RETT, M. S.; BERGAMO, V. F.; NASCIMENTO, M. G.  
Carcinoma Espinocelular de Pulmão – Marcadores Tumoriais In: VII Jornada Científica das Faculdades Integradas de Bauru, 2012, Bauru.  
**VII Jornada Científica das Faculdades Integradas de Bauru.** , 2012.

1. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; SILVA, L. R.; HILOMI, H. T.; MITSUYOSHI, R. H.; TOLEZANO, J. E.; LUCHEIS, S. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
**Análise dos Testes Sorológicos de Amostras de Soros Humanos da Região de Bauru - SP Enviados ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II para Confirmação de Leishmanioses Humana Visceral e Cutânea**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
2. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; SILVA, L. R.; NOBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
**Atividades de Educação em Saúde sobre Leishmaniose em Uma Escola Municipal na Cidade de Bauru - São Paulo**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
3. **LOSNAK, D.O.**; MARQUES, M. J. G.; GARCIA, M. Z.; SILVA, L. R.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
**Avaliação da Positividade de Marcadores Sorológicos para Hepatite B em Amostras de Soro de Pacientes de Bauru e Região Enviadas ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II - Bauru, SP**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
4. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; SILVA, L. R.; HILOMI, H. T.; MITSUYOSHI, R. H.; TOLEZANO, J. E.; LUCHEIS, S. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
**Positividade de Leishmaniose Humana em Exame Direto de Aspirados de Medula Óssea Enviados ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II - Bauru, SP**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. **LOSNAK, D.O.**; MARTINS, P. R.  
**Estudo Sorológico de Leishmaniose Visceral Canina em Amostras Enviadas ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II - Bauru - São Paulo**, 2014. (Outra,Apresentação de Trabalho)
6. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; HILOMI, H. T.; MITSUYOSHI, R. H.; TOLEZANO, J. E.; SILVA, L. R.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
**Evaluation of Chromatographic Immunoassay for the Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in the Region of Bauru**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
7. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C; MARQUES, M. J. G.; GARCIA, M. Z.; RICHINI-PEREIRA, V. B.  
**Diagnóstico de Dengue em municípios da região de Bauru - SP, no ano de 2012**, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
8. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C  
**Introdução a Imunologia**, 2013. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
9. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C  
**Leishmaniose em Saúde Pública no Município de Jaú - SP**, 2013. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
10. **LOSNAK, D.O.**; OLIVEIRA, C  
**Refrata: Detecção Molecular de Leishmania spp. em gatos do Município Andradina, São Paulo, Brasil**, 2013. (Outra,Apresentação de Trabalho)
11. **LOSNAK, D.O.**; RETT, M. S.; BERGAMO, V. F.  
**Carcinoma Espinocelular de Pulmão – Marcadores Tumorais**, 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)

## Eventos

### Eventos

#### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-graduação em Doenças Tropicais**, 2015. (Encontro)  
Positividade de Leishmaniose Humana em Exame Direto de Aspirados de Medula Óssea Enviados ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II - Bauru, SP.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **1º Encontro Nacional entre os Programas de Pós-**

**graduação em Doenças Tropicais**, 2015. (Encontro)  
 ATIVIDADES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE SOBRE LEISHMANIOSE EM UM ESCOLA MUNICIPAL NA CIDADE DE BAURU-SÃO PAULO.

3. **One Health Summer School**, 2015. (Encontro)

.

4. **Reunião Técnica da Subrede de Laboratórios de Leishmanioses**, 2015. (Outra)

.

5. **11ª Semana Nacional da Ciência e Tecnologia**, 2014. (Exposição)

.

6. **9º FisioFib**, 2014. (Feira)

.

7. **Ciclo de Palestras em Recentes Avanços em Microbiologia Médica, dos Alimentos e do Meio Ambiente**, 2014. (Outra)

.

8. **IX Jornada Científica das Faculdades Integradas de Bauru**, 2014. (Encontro)

Estudo Sorológico de Leishmaniose Visceral Canina em Amostras Enviadas ao Instituto Adolfo Lutz - CLR II - Bauru - São Paulo.

9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VIII Encontro da Pós Graduação**, 2014. (Encontro)

Evaluation of Chromatographic Immunoassay for the Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in the Region of Bauru.

10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **16º Encontro Nacional de Biomedicina**, 2013. (Encontro)

Diagnóstico de Dengue em municípios da região de Bauru - SP, no ano de 2012.

11. **2º Simposio Laboratorial em Saúde Pública da Região de Araçatuba (SI (SIMLASPRA) e 1º Simpósio de Leishmaniose**, 2013. (Simpósio)

.

12. **3º Encontro Multidisciplinar de Profissionais da Saúde**, 2013. (Encontro)

.

13. **FisioFib em Agudos**, 2013. (Outra)

.

14. **Palestra Eco epidemiologia molecular de importantes fungos causadores de micoses sistêmicas**, 2013. (Outra)

.

15. **Palestra Noções básicas no diagnóstico laboratorial das principais leveduras de interesse médico**, 2013. (Outra)

.

16. **VIII Jornada Científica das Faculdades Integradas de Bauru**, 2013. (Encontro)

.

17. **2º Encontro Multidisciplinar de Profissionais da Saúde das Faculdades Integradas de Bauru**, 2012. (Encontro)

.

18. **7º FisioFIB**, 2012. (Outra)

19. **FIBrincando**, 2012. (Outra)

.

20. **Palestra Interferentes Pré-Analítico em Laboratório Clínico**, 2012. (Outra)

.

21. **SIPAT (Semana Interna de Prevenção de Acidentes de Trabalho)**, 2012. (Outra)

.

22. **Semana Qualidade de Vida**, 2012. (Outra)

.

23. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Jornada Científica das Faculdades Integradas de Bauru**, 2012. (Encontro)

Carcinoma Espinocelular de Pulmão – Marcadores Tumorais.

24. **14º Encontro Nacional de Biomedicina**, 2011. (Encontro)

.

25. **1º Encontro Multidisciplinar de Profissionais da Saúde**, 2011. (Encontro)

.

26. **6º FISIOFIB NA COMUNIDADE**, 2011. (Outra)

.

27. **FIBrincando**, 2011. (Outra)

.

#### **Organização de evento**

1. **LOSNAK, D.O.**

**Capacitação da Campanha Fique Sabendo 2013**, 2013. (Outro, Organização de evento)

2. **LOSNAK, D.O.**

**3º Encontro Multidisciplinar de Profissionais da Saúde**, 2013. (Outro, Organização de evento)

3. **LOSNAK, D.O.**

**2º Encontro Multidisciplinar de Profissionais da Saúde**, 2012. (Outro, Organização de evento)

---

#### **Totais de produção**

##### **Produção bibliográfica**

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	16
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	2
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	6
Apresentações de trabalhos (Outra).....	3

##### **Eventos**

Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (encontro).....	12
Participações em eventos (outra).....	12
Organização de evento (outro).....	3