



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. E IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS
EM *Didelphis albiventris* LUND, 1841 (MARSUPIALIA: DIDELPHIDAE)**

RECIFE – PE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. E IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS
E SIFONÁPTEROS EM *Didelphis albiventris* LUND 1841 (MARSUPIALIA: DIDELPHIDAE)**

EDSON MOURA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE – PE

2016

Ficha catalográfica

S586d Silva, Edson Moura da
1841 Detecção de *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. e
identificação de ixodídeos em *Didelphis albiventris* Lund,
(Marsupialia: Didelphidae) / Edson Moura da Silva. – Recife,
2016.
92 f.: il.

Orientador: Leucio Câmara Alves.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.
Inclui referências.

1. Didelfídeos 2. Medicina da conservação 3. Biologia
molecular
I. Alves, Leucio Câmara, orientador II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. E IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS
EM *Didelphis albiventris* LUND 1841 (MARSUPIALIA: DIDELPHIDAE)**

EDSON MOURA DA SILVA

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Rafael Antonio Nascimento Ramos
Unidade Educacional Viçosa – UFAL

Prof^a Dr^a Maria Aparecida da Gloria Faustino
Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

*Ao meu avô José Amaro Gomes da Silva in
memoriam, fonte de inspiração, obrigado meu
velho, saudade do senhor.*

*Ao espírito da mãe natureza por
proteger-me quando estava muitas vezes
sozinho nas minhas coletas.*

*Aos Marsupiais, sem essas criaturas
maravilhosas meu trabalho não seria realizado.*

*Aos meus pais Benedita Emidio dos
Santos e Edinaldo Moura da Silva,
por todo amor, coragem e incentivo,
mesmo diante das dificuldades da vida
sempre me deram força.*

" Ontem um menino que brincava me falou

Que hoje é semente do amanhã

Para não ter medo que este tempo vai passar

Não se desespere não, nem pare de sonhar

*Nunca se entregue nasce sempre com as
manhãs*

Deixe a luz do sol brilha no céu do seu olhar

Fé na vida, fé no homem, fé no que virá

Nós podemos tudo, nós podemos mais

Vamos lá fazer o que será".

Gonzaguinha Jr.

Porque os anjos têm asas como as aves. Porque os homens têm pêlos como os bichos. E todos nós temos alma como Deus!

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui.

Aos meus irmãos Edna Moura, Carlos Henrique, Claudio Henrique, Wedja Moura e Anny Caroline e sobrinhos Guilherme dos Santos Silva, Eduarda dos Santos Silva, Wendson Moraes Moura, Gabrielle Moraes Moura e Evellyn Moura. Obrigado por existirem na minha vida, amo vocês.

À Juliana Cavalcanti, pelo companheirismo, paciência e perseverança, mesmo à distância sempre me ajudou, dando-me forças nas horas que mais precisei, obrigado minha nega.

Ao seu Cícero Leandro da Silva, por ter me ensinado a respeitar a natureza e viver em harmonia com a mesma, te agradeço meu velho pelos seus ensinamentos empíricos sobre a mãe natureza e também sou grato à sua mulher, a Dona Antônia Jorge Albuquerque, por me tratar como um filho.

Ao meu primeiro orientador, Wagner Porto, pela paciência, compreensão, e por ter me dado a chance de conhecer um mundo novo na vida acadêmica e científica.

Ao Professor Wilson Porto, por estar sempre disponível nas horas que necessito de seus conselhos.

Agradeço ao meu orientador, professor Leucio Câmara, pela oportunidade e confiança, por ter me dado à oportunidade de adentrar em seu laboratório, foi e será uma honra trabalhar com sua pessoa.

Aos meus amigos e colegas de infância, João Firmino, Cristina Firmino, Nivaldo Lacerda, Marquinho, Cristiano Luíz, Luciano de Jesus, Alex Brow, Marciel Ferreira, Renata Marques, Márcio Leandro, Orlando Aprígio, Osmar Aprígio, Fernando Moura, Simone Silva, Marcela Barbosa, Moisés Araújo, Hilton Araújo, Aldebaran Lacerda, Antonino Lopes, sou grato a vocês porque vejo nos olhos de todos sinceridade, orgulho e alegria de saber que estou realizando mais um sonho que não é só meu, mas também de todos vocês.

À minha irmãzinha Glaucia Grazielle, obrigado pela força e incentivo nas horas que pensei em fraquejar.

Ao Augusto Valença pelo companheirismo e amizade. Que Deus ilumine seus passos. Estarei sempre aqui quando precisares.

À Professora Marcia Paula da Universidade Federal do Piauí, por ter tido paciência comigo e por não negar sua ajuda nas horas que mais precisei.

Aos meus grandes amigos e irmãos que conquistei João Carlos Borges e Neurisvan Ramos Guerra, obrigado por me mostrar um mundo novo tanto no meio acadêmico como fora dele, que os espíritos de luz continuem iluminando vossos caminhos.

À equipe de Campo do LDP, Victor Fernandes, Irma Torres, Hévila Sandes, Neurisvan Ramos e José Alexandre. Agradeço a Deus por ter posto vocês na minha vida, pois apesar das nossas dificuldades sempre nos ajudamos.

À professora Maria Aparecida da Glória Faustino, pela sua constante disponibilidade.

À Sandra Torres, pela amizade, paciência e simplicidade.

À Débora Rochelly, pelo apoio e conselhos quando necessito.

À família Almeida, por estar sempre de portas abertas.

Aos demais companheiros do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE, Vinícius Vasconcelos, Edna Michelly, Nadine Louise, Luciana Ghinato, Francine França, Lorena Vescovi, Júlio Rodrigues, Fernanda Monteiro, Inês Cavalcanti, Maria Luiza, José Alexandre, Silvia Marques, Jussara Valença, Gisele Ramos, Ivanise Santana, Rodolfo Godoy, Carlos Diógenes, Andrea Calado, Everton Diogo, Ana Gabriella.

Aos Irmãos Ramos (Rafael Ramos e Ingrid Ramos), obrigado pela ajuda e pelos conselhos. Que os anjos de luz iluminem os seus caminhos.

Às pessoas que fazem parte do Laboratório de Doenças infectocontagiosas, em especial aos professores Rinaldo Mota, Wilton Junior e Leonildo Galiza e aos alunos de Pós-graduação Pomy Kim, Jonatas Campos, Renata Pimentel e Débora Viegas por ajudar quando necessitei.

Aos professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Jaqueline Bianque, Jean Carlos, Anísio Soares, Geraldo de Moura pelos ensinamentos.

Aos colegas, Gerci Nascimento, Ianne, Leonardo, Carmelia Amaral, Osani Muniz, obrigado pelas corridas do dia a dia, vocês são pessoas maravilhosas.

À Capes pelo apoio financeiro

À Universidade Federal Rural de Pernambuco que me acolheu e a todos os funcionários da referida instituição que direta e indiretamente contribuíram para minha formação.

LISTA DE ABREVIATURAS

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

LTA - Leishmaniose Tergumentar Americana

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

ELISA - Ensaio Imuno Enzimático

DPP –Dual Path Plataform

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

IHQ - Imuno-Histoquímica

RESUMO

Vários animais silvestres são descritos como reservatórios, hospedeiros e carreadores de agentes infecciosos e parasitários, tendo como destaque os marsupiais do gênero *Didelphis*, dentre eles o *Didelphis albiventris*. Devido ao hábito generalista e antrópico, esse animal é reconhecido como reservatório de vários agentes patogênicos, destacando-se *Cryptosporidium* spp., e *Leishmania* spp., além de servir como carreador de artrópodes que podem parasitar animais domésticos, silvestres e o homem. Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi detectar *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. e identificar Ixodídeos em *Didelphis albiventris*. Para captura foram utilizadas armadilhas tipo Tomahawk live trap. Um total de 40 animais foi capturado, sendo 29 fêmeas e 11 machos de vida livre pertencentes à Mesorregião Metropolitana do Recife e a Microrregião de Araripina, Pernambuco, Brasil. Amostras de fezes dos animais foram submetidas à técnica de centrífugo-sedimentação em formol-éter com posterior coloração pelo método de Kinyoun. Amostras de sangue também foram coletadas para investigar a infecção por *Leishmania* spp. pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), além de serem coletados ectoparasitas. Como resultado, foram observados que 15% (6/40) das amostras fecais dos *D. albiventris* estavam parasitadas com oocistos de *Cryptosporidium* spp., demonstrando que os mesmos podem atuar como importantes reservatórios deste parasita na interface urbano-florestal. Nenhuma das amostras foi positiva para *Leishmania* spp. pela PCR, ressaltando que os animais estudados não fazem parte do ciclo de vida desse agente nas áreas estudadas. Os ectoparasitas encontrados foram classificados como *Ixodes loricatus*, *Amblyomma rotundatum* e *Amblyomma* spp., sendo relatado pela primeira vez o parasitismo por *Amblyomma rotundatum* em *D. albiventris*.

Palavras-chave: Marsupiais, Medicina da conservação, Biologia molecular

ABSTRACT

Several wild animals are described as reservoirs, hosts and carriers of infectious and parasitic agents, especially the marsupials *Didelphis* genus, including the *Didelphis albiventris*. Due to the general and anthropic habit, this animal is recognized as a reservoir of various pathogens, especially *Cryptosporidium* spp. and *Leishmania* spp., besides serving as a carrier of arthropods that can parasitize domestic animals, wildlife and humans. Given this context, the objective of this study was to detect *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. and identify Ixodids in *Didelphis albiventris*. The capture was performed with the use of Tomahawk live trap. Physical containment was performed with the aid of appropriate leather gloves and chemical containment was performed with the association of Ketamine Hydrochloride (30 to 50 mg / kg / IM) and Xylazine (2 mg / kg / IM). A total of 40 animals were captured, 29 females and 11 males of free life belonging to the Metropolitan Mesoregion of Recife and the Micro-region of Araripina, Pernambuco, Brazil. Stool samples of the animals were subjected to centrifugal sedimentation technique in formalin-ether with subsequent staining Kinyoun method. Blood samples were also collected to investigate the infection by *Leishmania* spp. by Polymerase Chain Reaction (PCR) and are listed ectoparasites. As a result, it was observed that 15% (6/40) of the fecal samples of *D. albiventris* were parasitized with *Cryptosporidium* spp., demonstrating that they can act as important reservoirs of this parasite in the urban-wildland interface. None of the samples was positive for *Leishmania* spp. by PCR, noting that the animals are not part of the life cycle of this agent in studied areas. Ectoparasites found were rated as *Ixodes loricatus*, *Amblyomma rotundatum* and *Amblyomma* spp., being reported for the first time the parasitism by *Amblyomma rotundatum* in *D. albiventris*.

Keywords: Marsupials, Conservation medicine, Molecular biology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Marsupiais.....	19
2.2. Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em <i>Didelphis</i> spp.....	21
2.3. Infecção por <i>Leishmania</i> sp em <i>Didelphis</i> spp.....	23
2.4. Artrópodes ectoparasitos de <i>Didelphis</i> spp.....	25
3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
4.0 OBJETIVOS.....	45
4.1. Objetivo Geral.....	45
4.2 Objetivos específicos.....	45
ARTIGO 1- Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em <i>Didelphis albiventris</i> da Região Nordeste do Brasil.....	46
Resumo.....	47
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	49
Resultados.....	50
Discussão.....	50
Referências Biográficas.....	51
ARTIGO 2- <i>Leishmania</i> spp. em <i>Didelphis albiventris</i> na Região Nordeste do Brasil.....	56
Resumo.....	57
Abstract.....	57
Introdução.....	57
Material e métodos.....	59
Resultados.....	61
Discussão.....	62
Referências Bibliográficas.....	63

ARTIGO 3- Ticks in <i>Didelphis albivenris</i> (Lund, 1841) from the Northeastern region of Brazil.....	67
Abstract.....	68
Resumo.....	68
Introduction.....	68
Material and Methods.....	69
Results.....	70
Discussion.....	70
References.....	72

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os marsupiais são encontrados somente nas regiões Australianas (Austrália, Nova Guiné, Tasmânia e ilhas adjacentes) além do continente Americano, apesar de no passado terem se distribuído por todos os continentes, incluindo a Antártica (PALMAS, 2003).

Nas Américas existem três ordens de marsupiais (WILSON e REEDER, 2005), onde a Didelphimorphia engloba a maior parte dos marsupiais que povoam o continente americano (ROSSI et al., 2006). A família Didelphidae é a única família pertencente a essa ordem e compreende a maioria das espécies viventes de marsupiais do novo mundo (REIG, 1961).

Dentro dessa família encontra-se o gênero *Didelphis*, encontrado desde o Canadá até a Argentina, sendo representada por quatro espécies: *Didelphis aurita*, *D. marsupialis*, *D. albiventris* e *D. Virginiana*, sendo essa última a única espécie registrada em regiões temperadas da América do Norte (EMMOS e FEER, 1997; ANDRADE e FERNANDES, 2005).

Devido ao hábito generalista e antrópico, esses didelfídeos são reconhecidos como reservatórios de vários agentes patogênicos, destacando-se *Cryptosporidium* spp., e *Leishmania* spp., além de servirem como carreadores de artrópodes que podem parasitar animais domésticos, silvestres e o homem (LINARDI e GUIMARÃES, 2000; HUMBERG et al., 2012).

O gênero *Cryptosporidium* é um parasito gastroentérico oportunista capaz de infectar praticamente todas as espécies de vertebrados (BRIGGS et al., 2014). A transmissão desse agente é predominantemente fecal-oral, sendo a veiculação hídrica a principal via de disseminação (ONICHANDRAN et al., 2014).

Apesar da abundante literatura a respeito da ocorrência desse protozoário em hospedeiros humanos e animais domésticos, poucos são os estudos sobre o papel dos animais silvestres na manutenção e disseminação desse agente (THOMPSON et al., 2010), principalmente em marsupiais neotropicais (LALLO et al., 2009).

Por outro lado, as leishmanioses são complexos de doenças parasitárias de caráter zoonótico e constituem um grupo de enfermidades causadas por diferentes espécies de protozoários tripanosomatídeos, com distribuição cosmopolita, estando ausente unicamente na Antártida (GÁLLEGO, 2004) onde vários animais silvestres são hospedeiros (BRASIL, 2010).

Dentre os animais silvestres, os marsupiais, têm sido descritos como um importante reservatório silvestre das leishmanioses (ARIAS e NAIFF, 1981), no entanto, ainda existe uma lacuna sobre a epidemiologia e o papel desses animais na cadeia de transmissão das leishmanioses.

Não obstante, os ectoparasitas desses marsupiais desempenham um papel relevante como vetores de vários agentes patogênicos, entre eles os pertencentes às classes Insecta e Arachnida, tendo como destaque a ordem Ixodida.

A Ordem Ixodida é representada por carrapatos com distribuição mundial (SERRA-FREIRE e MELLO, 2006). Atualmente são catalogadas 896 espécies de carrapatos no mundo, divididas em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (GUGLIELMONE et al., 2010).

No Brasil, foram identificadas 55 espécies de carrapatos (GUIMARÃES et al., 2001), onde a família ixodidae engloba a maioria das espécies destes ácaros que parasitam animais domésticos e silvestres, especialmente marsupiais do gênero *Didelphis* (LABRUNA, 2004; SERRA-FREIRE e MELLO, 2006).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi detectar *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. e identificar Ixodídeos em *Didelphis albiventris*.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Marsupiais

Devido ao intenso deslocamento e à ocupação humana, extensas áreas periurbanas foram rapidamente incorporadas às cidades, provocando um desequilíbrio ambiental com total destruição de habitats naturais (NUNES, 2011), levando muitos animais silvestres a se adaptarem às condições urbanas, adquirindo hábitos sinantrópicos (LACERDA et al., 2010; NUNES, 2011).

Além disso, a ausência de predadores, abundância de abrigos e nichos ecológicos, potencializados pela maior tolerância por parte dos seres humanos à presença destes animais, foram outros fatores que contribuíram para a permanência desses animais nas cidades, particularmente os marsupiais (BRUN et al., 2007; CURITIBA, 2012).

Os marsupiais (latim científico: Marsupialia) constituem uma infraclasse de mamíferos, cuja principal diferença com os placentários, é a presença, na fêmea, de uma bolsa abdominal, conhecida como marsúpio (do latim *marsupium*), onde se processa grande parte do desenvolvimento dos filhotes (SMITH, 1996).

Atualmente, Marsupialia é formado por duas ordens: Ameridelphia que abrange Didelphimorphia e Paucituberculata, encontradas nas Américas; e Australidelphia que inclui Microbiotheria, Dasyuromorphia, Peramelemorphia, Notoryctemorphia e Diprotodontia, da região australiana (SPRINGER et al., 1998; AMRINE-MADSEN et al., 2003; ASHER et al., 2004), totalizando 331 espécies (WILSON e REEDER, 2005).

Os marsupiais pertencem a Família Didelphidae, Ordem Didelphimorphia, Infraclasse Metatheria, Subclasse Theria, Classe Mammalia (GARDNER, 2005). Encontram-se amplamente distribuídos pela região Neotropical, ocupando principalmente a América do Sul e Central. (WILSON e REEDER, 2005), sendo distribuídos em 16 gêneros e 97 espécies (VOSS e JANSÁ, 2009), com ocorrência de 55 espécies no Brasil (REIG, 1961; HUNSAKER, 1977).

Esses animais ocupam diferentes nichos ecológicos, desempenhando um papel importante nos ecossistemas (EMMOS e FEER, 1997), sendo encontrados em habitats arbustivos da Patagônia, seguindo pelas Cordilheiras dos Andes, Chaco e toda a extensão das florestas das planícies

subtropicais e tropicais. No Brasil esses didelfídeos são encontrados, na floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrados e Caatinga (EMMONS e FEER, 1997).

Possuem hábito solitário e crepuscular, com exceção da estação reprodutiva, onde machos e fêmeas passam vários dias juntos deslocando-se pelo solo e sobre árvores. (CERQUEIRA, 1984). Sua maturidade reprodutiva é alcançada aos seis meses de idade, e estes animais podem viver em média três anos na natureza e cinco em cativeiro (ALÉSSIO et al., 2004; DELCIELLOS et al., 2006). Por serem animais onívoros, sua dieta é basicamente constituída por roedores, aves de pequeno porte, rãs, lagartos, insetos, caranguejos e frutos variados (DELCIELLOS et al., 2006).

Dentro dessa família encontra-se o gênero *Didelphis*, com ocorrência desde o Canadá até a Argentina, sendo representada por quatro espécies: gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*), gambá-comum (*D. marsupialis*), gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) e gambá-da-virgínia (*D. virginiana*), sendo essa última registrada em regiões temperadas da América do Norte (EMMOS e FEER, 1997).

No Brasil são encontradas três espécies: *D. marsupialis*, proveniente da Amazônia (WALLACH e BOVER, 1983), *Didelphis aurita*, endêmica da mata Atlântica, com distribuição geográfica compreendendo a área entre o estado de Pernambuco e Santa Catarina, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, (FONSECA et al. 1996; KAJIN et al., 2008), e *D. albiventris*, um dos maiores marsupiais encontrados desde o Rio Grande do Sul até o Rio Grande do Norte, estando presente nas matas de galeria, podendo ocupar ambientes abertos, como cerrado, caatinga, pantanal, pampa, mata atlântica, além de áreas antrópicas (MARINHO FILHO et al., 1998; SILVA et al., 2008).

Devido ao hábito generalista destas espécies, e a capacidade de se adaptarem a diferentes ambientes, é possível encontrar esses didelfídeos facilmente na interface urbano-florestal (SCHALLIG et al., 2007). Essas características peculiares fazem desses marsupiais importantes reservatórios de patógenos com potencial zoonótico, dentre os quais se destacam: *Cryptosporidium* spp., e *Leishmania* spp., além de servirem como carreadores de artrópodes, (ABEL et al., 2000; MULLER et al., 2005; HUMBERG et al., 2012).

2.2 Infecção por *Cryptosporidium* spp. em *Didelphis* spp.

O gênero *Cryptosporidium* é um protozoário oportunista que possui distribuição mundial, causador de doença gastroentérica (XIAO, 2010). Atualmente, esse gênero possui 26 espécies descritas, e aproximadamente 60 genótipos, que podem infectar répteis, anfíbios, peixes, aves e mamíferos, inclusive o homem (CHALMERS e GILES, 2010; ELWIN et al., 2012; SLAPETA, 2013).

O ciclo biológico desse protozoário é monoxeno, onde todos os estágios de desenvolvimento (assexual e sexual) ocorrem em único hospedeiro, o que diferencia este protozoário dos demais coccídios (AMARANTE, 1992; O'DONOGHUE, 1995).

Inicia-se com a ingestão dos oocistos viáveis presentes na água ou alimentos contaminados, bem como nas fezes de animais e pessoas infectadas (CABRAL et al., 2001).. No trato gastrointestinal, os oocistos são desencistados pela ação de vários fatores incluindo condições redutoras, dióxido de carbono, temperatura, enzimas pancreáticas e sais biliares. Desta maneira, os esporozoítos infectantes são liberados. Estes ativamente procuram, fixam-se, invadem e tornam-se englobados pelas células epiteliais do hospedeiro na superfície luminal, formando um vacúolo parasitóforo de localização intracelular extracitoplasmática (PEREIRA, 2007; CHALMERS e DAVIES, 2010).

Uma organela de fixação ou de nutrição se desenvolve, e o esporozoíto torna-se mais esférico e diferencia-se em trofozoíto. Durante a maturação do trofozoíto ocorre a multiplicação assexual (esquizogonia ou merogonia) e resulta na formação de esquizonte ou meronte tipo 1 que contém 6 a 8 merozoítos. A ruptura do esquizonte resulta na liberação dos merozoítos que invadem as células epiteliais adjacentes, onde eles se desenvolvem subsequentemente em esquizonte tipo 2 que contém 4 merozoítos. Segue-se a reprodução sexual (gametogonia) pela diferenciação em microgamontes masculinos e macrogamontes femininos. Os microgamontes tornam-se multinucleados e liberam 32 os microgametas maduros que fertilizam os macrogametas dentro do macrogamonte feminino, produzindo um zigoto, que irá se diferenciar em dois tipos de oocistos: oocisto de parede fina, responsável pela auto-infecção, e o oocisto de parede espessa, que será eliminado nas fezes, constituindo a forma exógena infectante (XIAO e FAYER, 2008).

A transmissão desse agente ocorre pelo contato direto entre pessoas, animais, pessoa-animal ou de forma indireta pelo consumo de alimentos ou água contaminada, sendo esta última a principal fonte de infecção ao homem (BORGES et al., 2007; SPÓSITO FILHA e OLIVEIRA, 2009).

Quanto à ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais silvestres no mundo, a infecção tem sido diagnosticada em gorila (*Gorilla gorilla gorilla*) (VAN et al., 2010), cervídeo do Velho Mundo (*Capreolus capreolus*), javali-europeu (*Sus scrofa*) (CASTROHERMIDA et al., 2011), búfalo-africano (*Syncerus caffer*), impala (*Aepycerus melampus*), elefante-africano (*Loxodonta africana*) (ABU SAMRA et al., 2013), raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*), urso-pardo (*Ursus arctos*) (RAVASZOVA et al., 2012), furão (*Mustela vison*) (STUART et al., 2013), lêmures (*Prolemur simus* e *Microcebus rufus*) (RASAMBAINARIVO et al., 2013).

No Brasil, essa ocorrência foi descrita em rato doméstico (*Mus musculus*) (DALL'OLIO e FRANCO, 2004), capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (MEIRELES et al., 2007), tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) (SILVA et al., 2008), ratos do matos (*Akodon montensis*, *Thaptomys nigita*, *Sciurus aestuans*) (LALLO et al., 2009), ratão-do-banhado (*Myocastor coypus*) (SILVA et al., 2007; LUDWIG e MARQUES, 2011), gato-maracajá (*Leopardus weidii*), onça-parda (*Puma concolor*) (OLIVEIRA et al., 2008), teiú-branco (*Tupinambis teguixi*) (SILVA et al., 2008), ouriço-cacheiro (*Coendou villosus*) (SOARES et al., 2008), peixes-boi-amazônicos (*Trichechus inunguis*) (BORGES et al., 2007; 2011) e peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus manatus*) (BORGES et al., 2009), bugio-preto (*Alouatta caraya*), macaco-aranha-peruano (*Ateles chamek*) e macaco-da-noite (*Aotus nigriceps*) (LUDWIG e MARQUES, 2011), cascavel (*Caudisoma durissa*), jararaca-da-mata (*Bothrops jararaca*) e jiboia (*B. constrictor amarali*) (RUGGIERO et al., 2011).

Em marsupiais, a maioria dos trabalhos realizados foram com as espécies pertencentes ao continente Australiano (POWER et al., 2010; YANG et al., 2011) sendo descrito em antequino-marrom (*Antechinus stuartii*) (BARKER et al., 1978; MORGAN et al., 1997), canguru-vermelho e canguru cinza (*Macropus rufous* e *M. giganteus*) (POWER et al., 2004), quenda (*Isodon obesulus*), pademelon de barriga vermelha e pademelon de pescoço vermelho (*Thylogale billardieri* e *T. thetis*) (O'DONOGHUE, 1995; XIAO et al., 2003), wallaby cauda de anel (*Petrogale xanthopus*) (POWER et al., 2009) cusu-de-orelhas-grandes (*Trichosuris vulpecula*) (HILL et al., 2008), wombat de cabelo grosseiro (*Vombatus ursinus*) (POWER, 2002) e bilby-grande (*Macrotis lagotis*) (WARREN et al., 2003).

Com relação aos marsupiais encontrados no continente Americano, escassas são as pesquisas sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. sendo reportada a infecção em *D. virginiana* nos Estados Unidos da América (LINDSAY et al., 1988, OATES et al., 2012) e *D. albiventris* na Argentina (Santa Cruz et al., 1999). No Brasil, os únicos trabalhos realizados foram em *Didelphis* sp. (YAIIO et al., 1997; DALL'OLIO e FRANCO, 2004) e (gambá-de-orelha-branca) *D. albiventris* (ZANETTE et al., 2008; FARIAS et al., 2014).

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para o diagnóstico confirmatório da criptosporidiose, podendo ser estabelecido por meio de exames parasitológicos (sedimentação, flutuação ou a centrífugo-sedimentação) (KAR et al., 2011), técnica de coloração de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun (XIAO e CAMA, 2006) e verde malaquita (ELLIOT et al., 1999), além das técnicas sorológicas, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imuno Enzimático (ELISA) (SMITH e NICHOLS, 2010) ou métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase-PCR) (GARCÉS-SANCHEZ et al., 2009).

2.3 Infecção por *Leishmania* spp em *Didelphis* spp.

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias, causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo um importante problema de saúde pública (ALVAR et al., 2012).

Nas Américas essa doença pode se apresentar sob duas principais formas: Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (MELO, 2004; REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

A LVA é uma doença descrita em pelo menos doze países da América do Sul, sendo o Brasil responsável por cerca de 90% de todos os casos (ALVAR et al., 2012), enquanto que a LTA ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (BRASIL, 2010).

Segundo Alves e Faustino (2005), esse protozoário completa seu ciclo biológico em dois hospedeiros, a saber: O inseto flebotomíneo que abriga a forma promastigota do parasito e o hospedeiro mamífero, onde a forma amastigota é encontrada no interior de macrófagos. A forma infectante, também chamada de promastigota é transmitida aos hospedeiros vertebrados susceptíveis, completando assim o ciclo biológico (AWASTHI et al., 2004).

A principal forma de transmissão é vetorial, por intermédio da picada do inseto hematófago da Família Psychodidae, e Gêneros *Phlebotomus* (Velho mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (SHIMABUKURO e GALATI, 2010; ANDRADE et al., 2013).

Nas Américas, a LVA tem como agente o protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, o qual se encontra inserido no complexo *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* (MISSAWA e LIMA, 2006), tendo como principais vetores as espécies *Lutzomyia longipalpis*, *L. cruzi* e *L. forattinii* (SANTOS et al., 1998; LAINSON, 2010; PITA-PEREIRA et al., 2011).

Em relação à forma LTA, várias espécies do gênero *Leishmania* foram identificadas, dentre elas, quatro do subgênero *Leishmania* e nove do subgênero *Viannia* (LAINSON, 2010), onde as principais espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão são: *L. flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermédia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (BRASIL, 2010).

No ambiente doméstico, os cães são considerados os principais reservatórios da LVA, sendo estes de grande importância para manutenção do ciclo da doença (DANTAS-TORRES, 2007), os animais assintomáticos, por sua vez, favorecem a infecção dos vetores e sua transmissão para população canina e humana (SOLANO-GALLEGU et al., 2004; VERÇOSA et al., 2008).

Na LTA as espécies canina, equina e felina apresentam estreita associação com a doença na população humana, podendo atuar como reservatórios secundários ou acidentais por não serem capazes de manter o ciclo epidemiológico em um ecótopo (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; DANTAS-TORRES et al., 2006; TOLEZANO et al., 2007).

Em ambientes silvestres, os reservatórios das leishmanioses são carnívoros da família Canidae (CURI et al., 2006, FIGUEIREDO et al., 2008; SOUZA et al., 2010; JUSI et al., 2011), Felidae (LIBERT et al., 2012), roedores da família Echimyidae, Bunyaviridae, Cricetidae e Muridae (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; QUINNELL e COURTENAY, 2009; QUARESMA et al., 2011; DE FREITAS et al., 2012), Xenatras das famílias Bradypodidae e Megalonychidae (ARAÚJO et al., 2013; BRASIL, 2007), Primatas das famílias Pitheciidae, Aotidae e Atelidae (MALTA et al., 2010; ACARDI et al., 2013).

Os marsupiais neotropicais do gênero *Didelphis* têm sido alvo de diversos estudos por pesquisadores, uma vez que esses animais podem albergar *Leishmania* spp. (CARVALHO, 2005).

As primeiras descrições da participação desses marsupiais na epidemiologia das leishmanioses ocorreram no Brasil e Colômbia (YOSHIDA et al., 1979), onde foi demonstrado que esses animais podem se infectar e não apresentar sinais clínicos da doença, mantendo contudo, o agente em seu organismo servindo como reservatório (TRAVI et al., 1998). Posteriormente a infecção por *Leishmania (L) infantum* foi observada em *D. marsupialis* na Colômbia e Venezuela (CORREDOR et al., 1989), *D. albiventris* no Brasil (SHERLOCK et al, 1984; SHERLOCK, 1996; CARVALHO, 2005) e *D. aurita* (CARREIRA et al., 2012).

Ocorrência de infecção natural por *L. amazonensis* e *L. guyanensis* também foi reportada em *D. marsupialis* na Guiana Francesa e Brasil (ARIAS et al., 1981; GRIMALDI et al., 1991). Já as espécies *L. braziliensis* e *L. peruviana* foram encontradas em *D. albiventris* no Peru e Brasil respectivamente (LLANOS- CUENTAS et al., 1999; QUARESMA et al., 2011).

Nesses animais, o diagnóstico para confirmação do parasito pode ser realizado através do exame parasitológico direto, imuno-histoquímico (IHQ), por meio de testes imunológicos, como Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imuno Enzimático (ELISA), e Teste Rápido Imunocromatográfico (Dual Path Plataform - DPP), além dos métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) (LAURENTI, 2009; QUEIROZ-JR, 2011; SOLCÀ et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2013).

2.4 Parasitismo por Ixodídeos em *Didelphis* spp.

O estudo da ectoparasitofauna é imprescindível para uma melhor compreensão da relação artrópode/hospedeiro, e para o conhecimento de possíveis vetores de patógenos (ABEL et al., 2006). Essa relação é diretamente influenciada pela seleção natural, onde a sobrevivência do parasita e a perpetuação da sua progênie são altamente dependentes da sobrevivência do hospedeiro (ANDERSON e MAY, 1979).

Em ambiente natural, o comportamento dos ectoparasitos em relação aos seus hospedeiros é o resultado da coevolução entre as partes (JOHNSON e CLAYTON, 2004). Neste contexto a desfragmentação do habitat natural dos animais silvestres, ocasionada pela interferência do homem, contribuiu para o surgimento de novas associações de parasitas e hospedeiros, quebrando as relações de especificidade e introduzindo doenças que antes pertenciam exclusivamente aos animais silvestres e que agora fazem parte de uma ampla lista de animais domésticos e do homem (BARROS et al., 1993; DOBSON e GRENFELL, 1995).

Os ectoparasitos de importância para os didelfídeos pertencem às classes Insecta e Arachnida, destacando-se a ordem Ixodida.

Os ixodídeos são artrópodes pertencentes à ordem Acari e subordem Ixodida, e apresentam elevada dispersão mundial, sendo encontrados em diferentes espécies de animais domésticos, silvestres e humanos (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Estima-se que existam aproximadamente 870 espécies de ixodídeos descritas em todo o mundo, e destas, 55 espécies, pertencentes às famílias Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae já foram relatadas no Brasil (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

A distribuição desses artrópodes varia de acordo com adaptação das espécies às condições abióticas e bióticas encontradas conforme suas áreas de ocorrência (CABRERA e LABRUNA, 2009). As condições abióticas são representadas pela temperatura, fotoperíodo e atuam no ciclo dos carrapatos em suas fases de vida livre, enquanto que os fatores bióticos interferem pouco na sazonalidade destes parasitos e estão relacionados aos hospedeiros e às espécies de carrapatos envolvidas (FACCINI e BARROS BATTESTI, 2006).

A grande maioria dos carrapatos da família Ixodidae parasita exclusivamente animais silvestres (LABRUNA, 2004), particularmente marsupiais do gênero *Didelphis*, com representantes dos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma* e *Ornithodoros* (ARAGÃO, 1936).

No Brasil, na região Nordeste, Aragão (1936) e Fonseca (1957/8), relataram o parasitismo de *Ixodes loricatus*, *I. amarali*, *Amblyomma striatum*, e *Amblyomma* spp. em marsupiais das espécies *D. aurita*, *D. albiventris* e *Marodelphis domestica*, enquanto que no Sudeste, Sul e Centro-Oeste, *I. loricatus*, *I. didelphidis*, *I. amarali*, *I. auritulus*, *A. aureolatum*, *A. geayi*, *A. humerale* e ninfas de *Amblyomma* spp. em *D. aurita*, *D. albiventris*, *Didelphis* sp., e *Lutreolina crassicaudata*, *Metachirus nudicaudatus* e *Philander frenata* foram descritas parasitando esses animais (COUTINHO et al., 1999; BOSSI et al., 2002; GUGLIELMONE et al., 2003; MULLER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I.S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N.H.E.; SCHUMAKER, T.T. *Borrelia like Spirochetes* recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia County, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n.5, p.621–624, 2000.

ABEL, I.; PEDROZO, M. G. C.; BUENO, C. *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) em cães domésticos procedentes da reserva florestal do Boqueirão, município de Ingaí, Sul de Minas Gerais. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 73, n. 01, p. 111-112, 2006.

ABU SAMRA. N.; JORI, F.; XIAO, L.; RIKHOTSO, O.; THOMPSON, P. N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species at the wildlife/livestock interface of the Kruger National Park, South Africa. **Comparative Immunology, Microbiology e Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 295–302, 2013.

ACARDI, S.A.; RAGO, M.V.; LIOTTA, D.J.; FERNANDEZ-DUQUE, E.; SALOMON, O.D. *Leishmania* (Viannia) DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.193, p. 256–259, 2013.

AMARANTE, H. M. B. **Ocorrência do *Cryptosporidium* sp. em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes em Curitiba**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

AMRINE-MADSEN, H.; SCALLY, M.; WESTERMAN, M.; STANHOPE, M. J.; KRAJEWSKI, C.; SPRINGER, M. S. Nuclear gene sequences provide evidence for the monophyly of australidelphian marsupials. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28, n.2, 186–196, 2003.

ANDERSON, M. R.; MAY, R. M. Population biology of infectious diseases: Part I. **Nature**, v. 280, n. 2, p. 361-367, 1979.

ANDRADE, F.A.G.; FERNANDES, M.E.B. Mamíferos terrestres e voadores. In: M.E.B. FERNANDES (Ed.). **Os manguezais da costa norte brasileira**. São Luís: Fundação Rio Bacanga, 2005, p.156.

ANDRADE, A. J.; SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. On the taxonomic status of *Phlebotomus breviductus* Barretto, 1950 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Zootaxa**, v. 3734, p.477–484, 2013.

ANDERSON, M. R.; MAY, R. M. Population biology of infectious diseases: Part I. **Nature**, v.280, n.2, p. 361–367, 1979.

ALÉSSIO, F.M. **Comportamento de *Didelphis albiventris* em um remanescente de mata Atlântica no Nordeste do Brasil**: 2004. 39f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife–Pe.

ALVAR, J.; VELEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v.7, n.5, p.35–671, 2012.

ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. **Leishmaniose visceral canina. Manual da Schering-Plough**, São Paulo, 2005. 14 p.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759–843, 1936.

ARIAS, J.R.; NAIFF, R.D.; MILES, M.A.; SOUZA, A.A. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; v.75, n.4, p. 537–5, 1981.

ASHER, R. J.; HOROVITZ, I.; SANCHEZ-VILLAGRA, M. R. First combined cladistic analysis of marsupial mammal interrelationships. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v.33, n. 1, p. 240–250, 2004.

ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, n. 4, p. 759–843, 1936.

ARAÚJO, V.A.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E.; JANSEN, A.M.; ROQUE, A.L. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v.140, p. 455–460, 2013.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 19, p. 238–258, 2004.

BARKER, I.K.; BEVERIDGE, I.; BRADLEY, A.J.; LEE, A.K. Observations on spontaneous stress related mortality among males of the *Dasyurid Marsupial Antechinus stuartii*. **Australian Journal of Zoology**, v.26, p.435–448, 1978.

BARROS, D.M.; LINARDI, P.M.; BOTELHO, J.R. Ectoparasites of some wild rodents from Paraná state, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n.6, p.1068–1070, 1993.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3)/Butantan, 2006. 223 p.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Criptosporidiose: uma revisão sobre a sua implicação na conservação dos mamíferos aquáticos. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 091–096, 2007.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; Lima, D. S.; Luna, F. O.; C. V.C. Aguilar, C. V. C.; Vergara-Parente, J. E.; Faustino, M A G.; Lima, A. M .A.; Marmontel, M. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em manatí amazônico (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883). **Revista Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 63–66, 2007.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; VERGARA-PARENTE, J. E.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E. C. L. Ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em peixe boi marinho

(*Trichechus manatus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 60–61, 2009.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M A G.; MARMONTEL, M. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in antillean manatees (*trichechus manatus*) and amazonian manatees (*trichechus inunguis*) from Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.42, n.4, p. 593–596, 2011.

BOSSI, D. E. P.; LINHARES, A. X.; BERGALLO, H. G. Parasitic arthropods of some wild rodents from Juréia- Itatins Ecological Station, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.959–963, 2002.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde–2. ed. atual–Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. P. 180p.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 291–296, 2003.

BRIGGS, A. D.; BOXAL, N. S.; VAN SANTEN, D.; CHALMERS, R. M.; MCCARTHY, N. D. Approaches to the detection of very small, common, and easily missed outbreaks that together contribute substantially to human *Cryptosporidium* infection. **Epidemiology Infectology**, v. 142, n. 9, p. 76–1869, 2014.

BRUN, F. G. K.; LINK, D.; BRUN, E. J. O emprego da arborização na manutenção da biodiversidade de fauna em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v.2, n.1, p. 117–127, 2007.

CABRAL, D. D.; BARBOSA, F. C.; STRASSER, C.; BARSOTTI, S. R. H.; Exame de Fezes de Mamíferos Silvestres para Verificação de Parasitismo por *Cryptosporidium* sp. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 01, p. 77–83, 2001.

CABRERA, R. R., LABRUNA, M. B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1303–1309, 2009.

CARREIRA, J. C. A.; DA SILVA, A. V. M.; PEREIRA, D. D.; BRAZIL R. P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 5, p.111, 2012.

CARVALHO, M. R. **Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na Zona da Mata norte de Pernambuco**. 2005, 98f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 30, n. 179, p. 216–219, 2011.

CAVALCANTI, M.P.; DANTAS-TORRES, F.; ALBUQUERQUE, S. C. G.; MORAIS, R. C. S.; BRITO, M. E. F.; OTRANTO, D.; BRANDÃO- FILHO, S. P. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, p. 122–128, 2013.

CERQUEIRA, R. 1984. Reproduction de *Didelphis albiventris* dans le nord-est du Bresil (Polyprotodontia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 48, n.1, p. 95–104, 1984.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 138–146, 2010.

CHALMERS, R.M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1487–1497, 2010.

CORREDOR, A.; GALLEGOS, J. F.; TESH, R. B.; PELÁEZ, D.; DIAZ, A.; MONTILLA, M.; PALÁU, M. T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colômbia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 195, 1989.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M.; BOTELHO, J. R. Ectoparasitos de *Didelphis albiventris* na Estação Ecológica da UFMG, Belo Horizonte, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA. Minas Gerais. **Anais...** Poços de Caldas, 1999. p. 59.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 99–101, 2006.

CURITIBA. **Rede de Proteção Animal** – Cidade de Curitiba, 2012 Disponível em: Acesso em: < <http://www.protecaoanimal.curitiba.pr.gov.br/Conteudo/ProtecaoAnimal.aspx>>. Acesso em 15 setembro de 2015.

DALL’OLIO, A.J.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do sudeste brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p. 25–31, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; SOMÕES – MATOS, L.; BRITO, F. L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 11, n. 61, p. 32–40, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139–146, 2007.

DE FREITAS, T. P.; D’ANDREA, P. S.; DE PAULA, D. A.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BONVICINO, C. R. Natural infection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, p. 81–83, 2012.

DELICIELLOS, A.C.; LORETO, D.; ANTUNES, V. Z Marsupiais na mata atlântica. **Ciência Hoje**, v.38, p.6669, 2006.

DOBSON, A. P.; GRENFELL, B. T. **Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations**. Cambridge University Press, 1995. 521p.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 139–142, 1999.

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: A field guide**: Chicago, University of Chicago Press, XVI+, 1997.307p.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N. D.; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 7, p. 675–682, 2012.

FARIAS, M. P. O.; SANDES, H. M. M.; SILVA, E. M.; NASCIMENTO, G. G.; ALVES, L. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em *Didelphis albiventris* na Mesorregião do Sertão de Pernambuco. In: XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. **Anais...** Gramado – RS.2014.

FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Aspectos gerais da biologia e identificação de carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância Médico- Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/CTTD-3/Butantan, p. 5–10, 2006.

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA S. A.; FEDULO, L. P.; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D.A. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 200–201, 2008.

FONSECA, F. Inquérito sobre a fauna acarológica de parasitos no nordeste do Brasil. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 28, p. 99–186, 1957/1958.

FONSECA, G. A. B.; HERRMANN, G.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTON, J. L. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. **Conservation International & Fundação Biodiversitas**, Occasional paper n.4, 1996.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. **Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 661–676, 2004.

GARCÉS-SANCHEZ, G.; WILDERER, P. A.; MUNCH, J.; CHORN, H.; LEBUHN, M. Evaluation of two methods for quantification of *hsp70* mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. **Water Research**, v.43, n.10, p. 2669–2678, 2009.

GARDNER, A. L. Order Didelphimorphia. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 2005. p 15–23.

GRIMALDI, JR.; G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n.44, p. 645–661, 1991.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical Zoogeographic Region**. Netherlands: ICTTD-2, 2003. 173p.

GUGLIELMONE, A. A. et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1–28, 2010.

GUIMARÃES, J. C.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATESTTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001. 213p.

HILL, N. J., DEANE, E. M., POWER, M. L. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from common brushtail possums (*Trichosuris vulpecula*) adapted to urban settings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5549–5555, 2008.

HUMBERG, R. M.; OSHIRO, E. T.; CRUZ, M. S. P.; RIBOLLA, P. E., ALONSO, D. P.; FERREIRA, A. M.; BONAMIGO, R. A.; TASSO JR., N.; OLIVEIRA, A. G. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 470–472, 2012.

HUNSAKER, D. Ecology of new world marsupials. In: HUNSAKER, D. **The biology of marsupials**: Academic, 1977.p. 95–153.

JOHNSON, K. P.; CLAYTON, D. H. Untangling Coevolutionary History. **Systems Biology**, v. 53, n. 1, p. 92–94, 2004.

JUSI, M. M.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M.; TENÓRIO, M.; SOUSA, A. S. L.; MACHADO, O.R.Z. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p. 219–222, 2011.

KAJIN, M.; CERQUEIRA, R.; VIEIRA, M. V.; GENTILE, R. Nine-year demography of the black-eared opossum *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) using life tables. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n.2, p. 206–213, 2008.

KAR, S.; GAWLOWSKA, S.; DAUGSCHIES, A.; BANGOURA, B. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 366–370, 2011.

LABRUNA, M. B. Carrapatos. **A Hora Veterinária**, v.137, P. 63– 65,2004.

LACERDA, N. P.; SOUTO, P. C.; DIAS, R. S.; SOUTO, L. S.; SOUTO, J. S. Percepção dos residentes sobre a arborização da cidade de São José de Piranhas–PB. **REVSBAU**,v. 5,p. 4, 81–95, 2010.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p.13–32, 2010.

LALLO, M. A.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S. E.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E. F. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.5, 2009.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13–23, 2009.

LIBERT, C.; RAVEL, C.; PRATLONG, F.; LAMI, P.; DEREURE, J.; KECK, N. *Leishmania infantum* infection in two captive barbary lions (*Panthera leo leo*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, p. 685–688, 2012.

LINDSAY, D. S.; HENDRIX, C. M.; BLAGBURN, B. L. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in opossums *Didelphis virginiana*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, p. 157–159, 1988.

LLANOS-CUENTAS, E. A.; RONCAL, N.; VILLASECA, P.; PAZ, L.; OGUSUKU, E.; PEREZ, J. E. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 15–20, 1999.

LUDWIG, R.; MARQUES, S. M. T. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in mammals at a zoo in southern Brasil. **Revista Ibero-Latinoamericana**, v. 70, n. 1, p. 122–128, 2011.

MALTA, M. C.; TINOCO, H. P.; XAVIER, M. N. VIEIRA, A. L.; COSTA, E. A.; SANTOS, R. L. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169 p. 193–197, 2010.

MARINHO FILHO, J.; RODRIGUES, F. H. G.; GUIMARÃES M.M. **A Fauna de Vertebrados da Estação Ecológica de Águas Emendadas**. Brasília, 1998.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in capybara (*Hydrochoerus hydrochoerus*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 166–170, 2007.

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 41–45, 2004.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p.337–340, 2006.

MORGAN, U. M.; CONSTANTINE, C. C.; FORBES, D. A.; THOMPSON, R. C. A. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5, p. 825–830, 1997.

MULLER, G.; BRUM, J. G. W.; LANGONI, P. Q.; MICHELS, G. H.; SNKOC, A. L.; RUAS, J. L.; BERNE, M.E.A. *Didelphis albiventris* Lund, 1841, parasitado por *Ixodes loricatus* Neumann, 1899, e *Amblyomma aureolatum* Pallas, 1772, (Acari: Ixodidae) no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.319–324. 2005.

NUNES, M. **Fauna Urbana - a vida selvagem à nossa porta**. 2011. Disponível em: <http://naturlink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Fauna-e-Flora/content/Fauna-Urbana--a-vida-selvagem-a-nossa-porta?bl=1&viewall=true#Go_1>. Acesso em: 20 de setembro de 2015.

OATES, S. C.; MILLER, M. A.; HARDIN, D.; CONRAD, P. A.; MELLI, A.; JESSUP, D. A.; DOMINIK, C.; ROUG, A.; TINKER, M. T.; MILLER, W. A. Prevalence, Environmental Loading, and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* Isolates from Domestic and Wild Animals along the Central California Coast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.72–8762, 2012.

O'DONOGHUE, P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 139–195, 1995.

OLIVEIRA, C. B.; SOARES, F. J.; SILVA, A. S.; SILVA, M. K.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Ocorrência de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Leopardus weidii* de vida livre. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 546–547, 2008.

OLIVEIRA, H. H.; ALMEIDA, A. B.; CARVALHO, R. W.; GOMES, V.; SERRA FREIRE, N. M.; QUINELATO, I.; CARVALHO, A. G. Diversidade de ixodida em roedores e marsupiais capturados no Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.66, n.4, p.1097–1104, 2014.

ONICHANDRAN, S.; KUMAR, T.; SALIBAY, C. C.; DUNGCA, J. Z.; TABO, H. A.; TABO, N.; TAN, T. C.; LIM, Y. A.; SAWANGJAROEN, N.; PHIRIYASAMITH, S.; ANDIAPPAN, H.; ITHOI, I.; LAU, Y. L.; NISSAPATORN, V. Waterborne parasites: a current status from the Philippines. **Parasites & Vectors**, v. 28, n. 7, p. 244–251, 2014.

PALMA, R. E. Evolution of American marsupials and their phylogenetic relationships with Australian metatherians. In: Jones, M., Dickman, C. & Archer, M. (Eds). **Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials**. CSIRO Publishing, 2003.

PEREIRA, J. T., **Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia, Patologia) - Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

PITA-PEREIRA, D. D.; SOUZA, G. D.; PEREIRA, T. A.; ZWETSCH, A.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta tropica**, v.120, n. 3, 2011.

POWER, M. L. **Epidemiology of *Cryptosporidium* in eastern grey kangaroos *Macropus giganteus* inhabiting a Sydney water catchment**, Ph.D thesis. Macquarie University, Australia, 2002.

POWER, M. L.; SLADE, M. B.; SANGSTER, N. C.; VEAL, D. A. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* from a wild populations of eastern grey kangaroos *Macropus giganteus* inhabiting a water catchment. **Infection Genetics and Evolution**, v. 4, p. 56–97, 2004.

POWER, M. L.; CHEUNG-KWOK-SANG, C.; SLADE, M.; WILLIAMSON, S. Genetic diversity within the gp60 locus of *Cryptosporidium fayeri* from different marsupial hosts. **Experimental Parasitology**, v. 12, p. 219–223, 2009.

POWER, M. L. Biology of *Cryptosporidium* from marsupial hosts. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 40–44. 2010.

QUARESMA, P. F.; REGO, F. D.; BOTELHO, H. A.; DA SILVA, S. R.; MOURA -JUNIOR, A. J.; TEIXEIRA NETO, R. G. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, p. 579–585, 2011.

QUEIROZ-JR, E. M. **Validação Do Teste Imunocromatográfico Rápido Dual Path Platform Para O Diagnóstico Da Leishmaníase Visceral Canina**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2011.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915–1934, 2009.

RASAMBAINARIVO, F. T.; GILLESPIE, T. R.; WRIGHT, P. C.; ARSENAULT, J.; VILLENEUVE, A.; LAIR, S. Survey of *Giardia* and *Cryptosporidium* in lemurs from the 93 Ranomafana National Park, Madagascar. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 3, p. 741–743, 2013.

RAVASZOVA, P.; HALANOVA, M.; GOLDOVA, M.; VALENCAKOVA, A.; MALCEKOVA, B.; HURNÍKOVÁ, Z.; HALAN, M. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 469–471, 2012.

REIG, O. Teoria Del origin y desarrollo dela fauna de mamíferos de América Del Sur. **Monografia Natural**, v. 1, p. 1–161, 1961.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21–25, 2007.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nelio L. dos Reis, p. 27–66, 2006.

RUGGIERO, P. C.; ZACARIOTTI, R. L.; BONDAN, E. F.; LALLO; M . A. Prevalência de *Cryptosporidium serpentis* em serpentes de cativeiro. **Ciência Rural**, v.41, n.11, p.1975–1978, 2011.

SANTA CRUZ, A., BORDA, T., MONTENEGRO, A., GOMES, L., PRIETO, O., SCHEIBLER, N. 1999. **Estudio de ecto y endo parasitos de *Didelphis albiventris* (Comadreja overa), Marsupiala, Didelphidae**. Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas de la de la Secretaria General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste, Tomo IV, 1999.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. D.; DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 7–315, 1998.

SCHALLIG, H. D. F. H.; SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M. F. *Didelphis.marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil).**Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.7, p.38–393, 2007.

SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: L. F. Livros. 2006. 200 p.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n.6, p. 671–683, 1996.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI, J. R. G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n.4, p. 511, 1984.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Checklist of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from São Paulo State, Brazil, with notes on their geographical distribution. **Biota Neotropica**, v.11, p. 11:1–20, 2010.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 61–79, 2010.

SILVA, A. S.; SOARES, C. D. M.; GRESSLER, L. T.; LARA, V. M.; CARREGARO, A. B.; MONTEIRO, S. G. Criptosporidíase gastrointestinal em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10,n. 2, p. 175–177, 2008.

SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; TOCHETTO, C.; OLIVEIRA, C. B.; SOARES, J. F.; OTTO, M. A.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Physaloptera* sp., *Kalicephalus* sp. e *Cryptosporidium* sp. em lagarto (*Tupinambis teguixin*) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Zoociências**, v. 10, n. 3, p. 269–272, 2008.

SOARES, F. J.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; SILVA, M. K.; MARISCANO, G.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 548–550, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of

clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p. 7–12, 2004.

SOLCÀ, M. S. Uso de PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma abordagem comparativa de diferentes protocolos e tecidos. 2012. .93f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Bahia.

SOUZA, N. P.; ALMEIDA, A.; FREITAS, O. B.; PAZ, T. P. R.; DUTRA, C.; NAKAZATO, V.; SOUSA, L. V. R. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p. 333–335, 2010.

SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 957–70, 2013.

SPRINGER, M. S.; WESTERMAN, M.; KAVANAGH, J. R., BURK, A.; WOODBURNE, M. O.; KAO, D. J., KRAJEWSKI, C. The origin of the Australasian marsupial fauna and the phylogenetic affinities of the enigmatic monito del monte and marsupial mole. **Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences**, v. 265, n. 1413, p. 2381-2386, 1998.

SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S. M. Divulgação Técnica: Criptosporidiose. **Biológico**, v.71, n.01, p.17–19, 2009.

STUART, P.; GOLDEN, O.; ZINTL, A.; DE WAAL, T.; MULCAHY, G.; MCCARTHY, E.; LAWTON, C. A coprological survey of parasites of wild carnivores in Ireland. **Parasitology Research**, v. 112, n. 10, p. 3587–3593, 2013.

THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; SMITH, A. Parasites emerging disease and wildlife conservation. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n.10, p. 1163–1170, 2010.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149. n.3-4, p. 280-284, 2007.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.92, n.3, p. 8–275, 1998.

VAN, Z.; LANGHOUT, M.; REED, P.; FOX, M. Validation of multiple diagnostic techniques to detect *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in free-ranging western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and observations on the prevalence of these protozoan infections in two populations in Gabon. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 2, p. 210–217, 2010.

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS, C. M.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, S. M. M. S; CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 4, n. 45, 2008.

VOSS, R. S.; JANSÁ, S. A. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 322, p. 1–177, 2009.

WALLACH, J. D.; BOVER, W. J. Marsupialia and monotremes. IN: SAUNDERI, W. B. **Medical and Surgical Management. Disease of Exotic Animals**. p. 575 -611, 1983.

WARREN, K. S.; SWAN, R. A.; MORGAN-RYAN, U. M.; FRIEND, J. A.; ELLIOT, A. *Cryptosporidium muris* infection in bilbies (*Macrotis lagotis*). **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p. 739–741, 2003.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world**: Johns Hopkins University Press, 2005.

XIAO, L.; SULAIMAN, I. M.; RYAN, U. M.; ZHOU, L.; ATWILL, E. R.; TISCHLER, M. L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A. A. Host adaptation and host-parasite co-evolution

Cryptosporidium: implications for taxonom and public health. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 73–1785, 2003.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites**. Springer: US, 2006, p. 108.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.1239–1255, 2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.

YAI, L. O. O.; BAUAD, A. R.; HIRSCHFELD, M. P. M.; SUMMA, M. E. L.; DA SILVA, A. M. J, DAMACENO, J. T. Estudo da ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em *Didelphis* sp. (GAMBÁ) na grande São Paulo. In: **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**. 6 (2) suplemento 1. X Seminario Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. I Seminario brasileiro de Parasitologia Veterinaria dos Países do MERCOSUR. Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. Itapema. S.C. 1997. p.347.

YANG, R.; FENWICK, S.; POTTER, A.; NG, J. RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes in kangaroos from Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v.179, p. 22–27, 2011.

YOSHIDA, E. L.; SILVA, R. L.; CORTEZ JR, L. S.; CORREA, F. M. Finding of *Leishmania* species in *Didelphis marsupialis aurita* in the state of Sao Paulo, Brazil. preliminary note. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.2, n.2, p. 110–3, 1979.

ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; LUNARDI, F. SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Occurrence of gastrointestinal protozoa in *Didelphis albiventris* (opossum) in the central region of Rio Grande do Sul state. **Parasitology International**, v, 57, p. 217–218, 2008.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Detectar *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. e identificar Ixodídeos em *Didelphis albiventris* na Mesorregião Metropolitana do Recife e Microrregião de Araripina no estado de Pernambuco, Brasil.

4.2 Objetivos específicos

Detectar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de *Didelphis albiventris* por meio da técnica de Kinyoun;

Detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em *Didelphis albiventris* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);

Identificar as espécies de ixodídeos que parasitam os *Didelphis albiventris*.

ARTIGO 1

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) da Região Nordeste do Brasil

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) da Região Nordeste do Brasil

Resumo

Cryptosporidium spp. é um protozoário zoonótico predominantemente gastroentérico de distribuição cosmopolita, capaz de acometer humanos, animais domésticos e um copioso número de animais silvestres. Várias espécies de animais selvagens são consideradas importantes reservatórios e fontes de infecção deste parasito. Dentre esses animais, o marsupial da espécie *Didelphis albiventris* destaca-se por possuir hábitos alimentares generalistas, tornando-se um hospedeiro e carreador de uma gama de agentes infecciosos de grande importância para saúde pública, a exemplo do *Cryptosporidium* spp. Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em *Didelphis albiventris* pertencentes a Mesorregião Metropolitana do Recife e Microrregião de Araripina estado de Pernambuco, Brasil. Um total de 40 animais, dos quais 29 fêmeas e 11 machos, foram capturados com o auxílio de armadilhas *Tamahawk* do tipo *live trap*. Destes, 16 eram filhotes, 13 jovens e 11 adultos, sendo 10 animais pertencentes à Microrregião de Araripina e 30 à Mesorregião Metropolitana do Recife. Amostras fecais desses animais foram coletadas e examinadas através da técnica de centrífugo-sedimentação em formol-éter com posterior coloração pela técnica de Kinyoun. O diagnóstico parasitológico revelou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 15% (6/40) das amostras analisadas. Destes, 50% (3/6) eram filhotes (duas fêmeas e um macho) e 50% (3/6) adultos (duas fêmeas ambos com filhotes no marsúpio e um macho) dos quais 33,3% (2/6) foram da Microrregião de Araripina e 66,7% (4/6) da Mesorregião Metropolitana do Recife. Das amostras positivas, 83% (5/6) foram provenientes de animais capturados em área urbana. Desta forma, a abundância de *D. albiventris* em áreas urbanas e periurbanas com ocorrência de *Cryptosporidium* spp., representa um risco na transmissão deste protozoário aos humanos e outras espécies de animais domésticos.

Palavras-chave: Pequenos Mamíferos, Marsupiais, Diagnóstico Molecular, Vida Selvagem

Abstract

Cryptosporidium spp. is a predominantly gastroenteric zoonotic protozoan with worldwide distribution, which affects humans, domestic animals and a copious number of wild animals. Several wildlife species are considered important reservoirs and sources of infection of this parasite. Among these animals, marsupial of the *Didelphis albiventris* species stands out for having general feeding habits, becoming a host and carrier of a range of infectious agents of great importance to public health, such as the *Cryptosporidium* spp. Thus, this study aimed to identify the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in *Didelphis albiventris* belonging to Metropolitan Mesoregion of Recife and Araripina micro-region of the state of Pernambuco, Brazil. 40 animals were captured with the aid of *Tomahawk live trap*, which 10 animals belonged to the micro-region of Araripina and 30 to the Metropolitan Mesoregion of Recife. From the captured animals, 29 were females and 11 males. Of these, 16 were cubs, 13 youth and 11 adults. Physical containment was performed with the aid of appropriate leather gloves and chemical containment was performed with the association of Ketamine Hydrochloride (30 to 50 mg / kg / IM) and Xylazine (2 mg / kg / IM). Fecal samples of captured animals were collected and examined by centrifugal sedimentation technique in formalin-ether with subsequent staining by Kinyoun. The parasitological diagnosis revealed the presence of *Cryptosporidium* spp. in 15% (6/40) of the samples. Of these, 50% (3/6) were from young animals

(two females and one male) and 50% (3/6) from adults (two females with cubs and one male) of which 33.3% (2/6) were the Microregion of Araripina and 66.7% (4/6) of the Metropolitan Messorregião of Recife. Of the positive samples, 83% (5/6) were from animals captured in urban areas. Thus, the abundance of *D. albiventris* with occurrence of *Cryptosporidium* spp. in urban and peri-urban areas is a risk in the transmission of this parasite to humans and other domestic animals.

Keywords: Small Mammals, Marsupials, Molecular Diagnostics, Wild life

Introdução

Cryptosporidium spp. é um protozoário entérico pertencente ao filo Apicomplexa, que possui a capacidade de infectar praticamente todos as espécies de vertebrados (FAYER et al., 2000), sendo reconhecidas atualmente, 26 espécies, distribuídas em 60 genótipos (SHI et al., 2010; ELWIN et al., 2012). Animais domésticos e selvagens são susceptíveis a infecção por diversas espécies e genótipos desse coccídio, muitos dos quais são encontrados em humanos (XIAO e FAYER, 2008).

Infecções por *Cryptosporidium* são frequentemente associadas a enterites que são caracterizadas por diarreia aquosa ou esteatorréica e cólica levando a desidratação intensa e má – absorção alimentar, podendo ser muitas vezes fatal (ARAÚJO et al., 2008; JEX et al., 2008).

A transmissão deste coccídio ocorre pela propagação fecal-oral de oocistos por contato direto com pessoas ou animais ou de forma indireta através do consumo de alimentos ou água contaminada, sendo a veiculação hídrica a principal fonte de infecção para os animais e humanos (CHALMERS e GILES, 2010; HILL et al., 2011). Contudo existem evidências sugerindo que um grande número de hospedeiros, incluindo animais selvagens, pode estar envolvido na cadeia de transmissão desse parasita (APPELBEE et al., 2005).

Neste contexto em função dos hábitos sinantrópicos de alguns animais silvestres, colonizando habitações humanas e seus arredores, os didelfídeos têm sido apontados como elemento importante na cadeia de transmissão do *Cryptosporidium* spp. (YAI et al., 1997; ZANETTE et al., 2008).

Neste sentido, *Didelphis virginiana* tem sido capaz de se infectar via oral com oocistos de *Cryptosporidium parvum* provenientes de bovinos, podendo desenvolver todos os estágios do ciclo do patógeno, inclusive com eliminação de oocisto (LINDSAY et al., 1988).

Apesar dessa constatação da caracterização genética de *C. parvum*, em Koala (*Phascolarctos cinereu*) e canguru (*Macropus* spp) (FAYER et al., 2000), no Brasil, as descrições sobre o encontro desse coccídios em didelfídeo são escassas (LALLO et al., 2009).

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em *Didelphis albiventris* pertencentes à Mesorregião Metropolitana do Recife e Microrregião de Araripina estado de Pernambuco, Brasil.

Material e Métodos

Aspectos éticos

Para execução do trabalho, todos os procedimentos foram realizados mediante aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), licença número 103/2015 e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) número 23608-2.

Área de estudo

O estudo foi realizado de março de 2014 a janeiro de 2015. As coletas foram conduzidas na interface Urbano-florestal do bioma Mata Atlântica localizado na Mesorregião Metropolitana do Recife (8° 04' 03''S e 34° 55' 00'' O) e no bioma Caatinga Localizado na Microrregião de Araripina (07° 46' 42" S e 39° 56' 28" O), ambos no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil (IBGE, 2015).

Captura dos animais e coleta de material biológico

Para captura dos animais utilizou-se armadilhas, do tipo *Tomahawk live trap* (dimensões: 0,45x0,21x0,21m), sendo de arame galvanizado, com o desarme do tipo gancho, e estas mantidas à uma distância de 20 metros entre si. Para atração dos marsupiais foram utilizadas iscas como abacaxi e paçoca de amendoim. As armadilhas permaneceram no mesmo local por oito dias, sendo checadas uma vez ao dia, a partir de 5:00 horas da manhã, realizando a troca das iscas diariamente a partir das 17:00 horas, totalizando um esforço de 480 armadilhas/ noites.

Após a captura, os animais foram contidos fisicamente utilizando-se luvas de raspa de couro, submetidos à pesagem e contenção química com a associação de cloridrato de cetamina, na dose de 30 a 50 mg/kg (50 mg/ml; Vetanarcol, König, Santana de Paraiba, Brazil) e cloridrato de xilazina na dose de 2mg/kg (20 mg/ml; Xilazin, Syntec, Brazil) pela via intramuscular (MALTA E LUPPI, 2006), para posterior avaliação clínica.

Foram coletadas amostras fecais das armadilhas ou diretamente da cloaca de 40 animais capturados, sendo as mesmas conservadas em frascos devidamente identificados, contendo solução por álcool 70%, formol e ácido acético (AFA) em proporções recomendadas por Ueno e Gonçalves (1994).

Todos os animais capturados receberam marcação com tatuagem. Ao término do manejo dos marsupiais, aguardou-se o retorno completo da sedação e posteriormente liberação à vida livre, no mesmo local onde foram capturados.

Processamento Laboratorial

Para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. as amostras fecais foram centrifugadas e submetidas à sedimentação pelo formol-éter com posterior confecção dos esfregaços e coloração através da técnica de Kinyoun (BRASIL, 1996). A leitura procedeu-se em microscópio óptico, na objetiva de 40x com posterior confirmação na objetiva de 100x sob imersão.

Resultados

Um total de 40 *D. albiventris* (29 fêmeas e 11 machos) foram capturados, dentro dos quais 16 eram filhotes, 13 jovens e 11 adultos, conforme a classificação etária descrita por Macedo et al. (2006). Sendo 10 animais pertencentes à Microrregião de Araripina, e 30 à microrregião de Recife.

O diagnóstico parasitológico revelou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 15% (6/40) das amostras analisadas, destes três eram filhotes (duas fêmeas e um macho), duas fêmeas (ambos com filhotes no marsúpio) e um macho adulto. Dos quais 33,3% (2/6) foram da Microrregião de Araripina e 66,6% (4/6) da Messorregião Metropolitana do Recife, sendo que 83% das amostras positivas foram provenientes de animais capturados em área urbana.

Discussão

A frequência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em *D. albiventris* aqui observada, foi inferior aquela registrada por Santa Cruz et al. (1999), que obtiveram a frequência de 24% de animais positivos na Argentina e por Zanetti et al. (2008) que relataram a positividade de 50% em *D. albiventris* na região central do Rio Grande do Sul, Brasil.

Por outro lado, o resultado aqui relatado foi superior aqueles reportados por Yai et al. (1997) que identificaram *Cryptosporidium* spp. em 10% dos didelfídeos capturados em parques e áreas urbanas da cidade de São Paulo, Brasil e Farias et al. (2014), que constatarem infecção por este protozoário em 5,26% das amostras fecais de *D. albiventris* da Mesorregião do Sertão de Pernambuco, Brasil.

A variação da frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em didelfídeos pode ser devido às diversas condições ambientais entre os locais de captura, particularmente urbana, além das técnicas de diagnóstico utilizadas (DALL'OLIO e FRANCO, 2004; SILVA et al., 2015).

Dos seis marsupiais, com exame parasitológico positivo, observou-se que nenhum deles demonstrava sinais clínicos sugestivos da infecção por *Cryptosporidium* spp. Vale ressaltar que nem todos os animais que são diagnosticados com a infecção por esse agente possuem evidências de manifestações clínicas, podendo atuar assintomaticamente como fontes de infecção desse patógeno, albergando-o em seu trato intestinal e eliminando oocistos viáveis ao ambiente (BOYER e KUCZYNSKA, 2010).

Em relação ao número de animais capturados, houve uma maior frequência na Mesorregião Metropolitana do Recife localizada no bioma Mata Atlântica. Esse bioma é rico em diversidade de árvores e recursos hídricos (ALVES, 2001), que pode influenciar na rica cadeia alimentar desses animais, diferentemente da Microrregião de Araripina formada pelo bioma Caatinga que é escasso de recursos hídricos e alimentar (CRUZ et. al., 1999) o que pode estar relacionado ao menor número de captura nesse bioma.

Outro aspecto importante aqui observado foi que 83,33% (5/6) dos animais positivos encontravam-se no perímetro urbano, o que corrobora com Hill et al. (2008), que observaram maior frequência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em Cusu comum (*Trichosurus vulpecula*) em ambientes urbanos. Por esta razão, o conhecimento sobre a criptosporidiose e seus aspectos

epidemiológicos, torna-se essencial sob o ponto de vista da saúde pública, havendo a necessidade da ampliação de estudos envolvendo a população de didelfídeos e a contaminação ambiental (SILVA et al., 2015).

Neste sentido, 50% (3/6) dos animais positivos capturados nas duas regiões estudadas estavam próximos a mananciais e reservatórios de águas, sugerindo assim uma possível contaminação no manancial aquático, proporcionando riscos à saúde pública (POWER, 2010).

Sendo assim, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em *D. albiventris* nas áreas estudadas, faz desses animais uma possível fonte de disseminação do patógeno para outras populações de animais, incluindo o homem.

Referências Bibliográficas

ALVES, J. R. P. **Manguezais: educar para proteger**. - Rio de Janeiro: FEMAR: SEMADS, 2001. 96 p.

APPELBEE, A.J. THOMPSON, R. C, OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife- current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v.21, p.370–376, 2005.

ARAÚJO, A. J.; KANAMURA, H. Y.; ALMEIDA, M. E.; GOMES, A.H.; PINTO, T.H.; DA SILVA, A. J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from hiv-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, 2008.

BOYER, D. G.; KUCZYNSKA, E. Prevalence and concentration of *Cryptosporidium* oocysts in beef cattlenpaddock soils and forage. **Foodborn Pathogens and Disease**, v. 7, n. 8, p. 893–900, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: Técnicas de diagnóstico**. Brasília, DF, 1996, 27p.

CHALMERS, R. M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK—challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.5, p.1487–1497, 2010.

CRUZ, P. H. COIMBRA, R. M., FREITAS, M. A. V. Vulnerabilidade climática e recursos hídricos no Nordeste. In.: **O Estado das águas no Brasil**. Freitas, M.A.V. de. Ed. Brasília, DF: ANEEL/SIH/MMH/SRH/MME, 1999. 334p.

DALL'OLIO, A.J.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do sudeste brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.25–31, 2004.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N. D.; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. **International Journal for Parasitology**, v.42, p.675–682, 2012.

FARIAS, M. P. O; SANDES, H. M. M; SILVA, E. M; NASCIMENTO, G. G; ALVES, L. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em *Didelphis albiventris* na Mesorregião do Sertão de Pernambuco. Anais. **XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Gramado - RS.2014.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.1305–1322, 2000.

HILL, N. J.; DEANE, E. M.; POWER, M. L. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from common brushtail possums (*Trichosuris vulpecula*) adapted to urban settings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n, 17, p. 55–5549, 2008.

HILL, A.; NALLY, P.; CHALMERS, R. M.; PRITCHARD, G. C.; GILES, M. Quantitative risk assessment for zoonotic transmission of *Cryptosporidium parvum* infection attributable to recreational use on farmland. **Zoonose and Public Health**, v. 58, n. 5, p. 323–333, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (IBGE) Geociências. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/lixo_coletado/lixo_coletado110.shtm>. acessado em 15/10/2015.

JEX. A. R.; PANGASA, A.; CAMPBELL, B. E.; WHIPP, M.; HOGG, G.; SINCLAIR, M. I.; STEVENS, M.; GASSER, R. B. Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with

Sporadic Cryptosporidiosis by Use of Sequence-Based Multilocus Analysis following Mutation Scanning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2252–2262, 2008.

LALLO, M. A; PEREIRA, A; ARAÚJO, R; FAVORITO, S. E; BERTOLLA, P; BONDAN, E. F. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1465–1470, 2009.

LINDSAY, D. S.; HENDRIX, C. M.; BLAGBURN, B. L. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in opossums (*Didelphis virginiana*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.24, n.1, p.157-159, 1988.

MACEDO, J.; LORETTO, D.; VIEIRA, M. V.; CERQUEIRA, R. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. **Mastozoología Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 133–136, 2006.

MALTA, M. C. C. e LUPPI, M. M. Marsupialia-Didelphimorphia (gambá, cuíca). In: ZALMIR, S. C; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006; Cap. 23, p. 340–357.

POWER, M. L. Biology of *Cryptosporidium* from marsupial hosts. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 40–44. 2010.

SANTA CRUZ, A., BORDA, T., MONTENEGRO, A., GOMES, L., PRIETO, O., SCHEIBLER, N. 1999. **Estudio de ecto y endo parasitos de *Didelphis albiventris* (Comadreja overa), Marsupialia, Didelphidae**. Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas de la de la Secretaria General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste, Tomo IV, 1999.

SHI, K.; JIAN, F; LV, C; NING, C; ZHANG, L; REN, X; DEAREN, T.K; LI, N; QI, M; XIAO, L. Prevalence, genetic characteristics, and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species causing infections in farm rabbits in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.3263–3266, 2010.

SILVA, G. R; SANTANA, I. M; FERREIRA, A.C.M.S; BORGES, J. C. G; ALVES. L. C, FAUSTINO, M. A. G. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em felinos de Recife, PE, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n.3, p. 408–417,2015.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1994.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, v.38, p.1239–1255, 2008.

YAI, L. O. O.; BAUAD, A. R.; HIRSCHFELD, M. P. M.; SUMMA, M. E. L.; DA SILVA, A. M. J, DAMACENO, J. T. Estudo da ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em *Didelphis* sp. (GAMBÁ) na grande São Paulo. In: **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**. 6 (2) suplemento 1. X Seminario Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. I Seminario brasileiro de Parasitologia Veterinaria dos Países do MERCOSUR. Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. Itapema. S.C. 1997. p.347.

ZANETTE, R. A; SILVA, ; A. S; LUNARDI, F; SANTURIO, J. M; MONTEIRO, S. G. Occurrence of gastrointestinal protozoa in *Didelphis albiventris* (opossum) in the central region of Rio Grande do Sul state. **Parasitology International**, v. 57, p.217–218, 2008.

ARTIGO 2

Leishmania spp. em *Didelphis albiventris* (Lund, 1841)

***Leishmania* spp. em *Didelphis albiventris* (Lund, 1841)**

Resumo

A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que afeta milhões de pessoas no mundo, tendo como reservatório uma grande diversidade de animais, incluindo os mamíferos silvestres, donde os marsupiais do gênero *Didelphis* são considerados os mais importantes devido ao hábito sinantrópico, que faz com que atuem na manutenção do ciclo de transmissão dessa doença. Diante disso, este trabalho teve como objetivo detectar *leishmania* spp. em *Didelphis albiventris* pertencentes a Mesorregião Metropolitana do Recife e a Microrregião de Araripina estado de Pernambuco, Brasil, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram capturados 40 animais com o uso de armadilhas *Tomahawk* do tipo *live trap*, sendo 10 pertencentes à Microrregião de Araripina e 30 à Mesorregião Metropolitana do Recife. Dos animais capturados, 29 eram fêmeas e 11 machos. Destes, 16 eram filhotes, 13 jovens e 11 adulto. A contenção física foi realizada com auxílio de luvas de raspas de couro apropriadas e a contenção química foi realizada com associação de fármacos Cloridrato de Cetamina (30 a 50 mg/kg/IM) e Cloridrato de Xilazina (2mg/kg/IM). Amostras de sangue foram obtidas por punção intracardíaca e processadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Após as análises, todas as amostras resultaram negativas para *leishmania* spp., sugerindo que *D. albiventris* não participe do ciclo enzoótico desse parasito nas localidades estudadas.

Palavras-chaves: Leishmaniose, Animais silvestres, Biologia molecular, Zoonose

Abstract

Leishmaniasis is a zoonotic disease that affects millions of people in the world which has as reservoirs a wide variety of animals, including wild mammals, where the marsupials from *Didelphis* genus are considered the most important because of synanthropic habits, which makes them to operate in maintaining of the transmission cycle of the disease. Thus, this study aimed to detect *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* belonging to Metropolitan Mesoregion of Recife and the micro-region of Araripina State of Pernambuco, Brazil, through the Polymerase Chain Reaction (PCR). 40 animals were captured with the aid of *Tomahawk live trap*, 10 belonging to the micro-region of Araripina and 30 the Metropolitan Mesoregion of Recife. From the captured animals, 29 were females and 11 males. Of these, 16 were cubs, 13 youth and 11 adults. Physical containment was performed with the aid of appropriate leather gloves and chemical containment was performed with the association of Ketamine Hydrochloride (30 to 50 mg / kg / IM) and Xylazine (2 mg / kg / IM). Blood samples were obtained by intracardiac puncture and processed by PCR technique. After analysis, all samples were negative for *Leishmania* spp., Suggesting that *D. albiventris* do not participate in the enzootic cycle of this parasite in the studied locations.

Keywords: Leishmaniasis, Wild animals, Molecular biology, Zoonosis

Introdução

Os avanços da agricultura e da pecuária próximos às áreas naturais, e a ação ofensiva dos seres humanos nos ecossistemas propiciou o surgimento de novas interações entre os animais silvestres e o homem. Esse contato promoveu a formação de novos ecótopos e a disseminação de agentes infecciosos e parasitários (CORRÊA e PASSOS, 2001), particularmente as infecções causadas por *Leishmania* spp.

Atualmente as leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica, sendo registradas em áreas consideradas previamente como não endêmicas. Essas doenças, que inicialmente tinham um caráter eminentemente rural e/ou silvestre, expandiram-se para as áreas urbanas e periurbanas (WHO, 2002).

Dependendo da espécie de protozoário envolvido, da resposta imune de cada hospedeiro, dos aspectos clínicos, as leishmanioses, nas Américas, apresentam duas formas distintas: a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (MELO, 2004; REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

Nas Américas, o Brasil representa o país de maior endemicidade da Leishmaniose Visceral Americana, sendo responsável por aproximadamente 97% de todos os casos no continente (PASTORINO et al., 2002), onde a maior incidência encontra-se na região Nordeste com 65% do total de casos notificados (BRASIL, 2003).

Por sua vez, no estado de Pernambuco, a LVA difundiu-se não só nas áreas clássicas do Agreste e Sertão Pernambucano, onde está concentrado um número importante de casos, mas também em outras regiões, notadamente na Região Metropolitana do Recife (DANTAS-TORRES e BRANDÃO FILHO, 2006).

A Leishmaniose Tegumentar Americana apresenta-se em franca expansão geográfica no Brasil, e atualmente, sua ocorrência não mais se restringe às áreas onde pessoas entram em contato com matas e animais silvestres, mas ocorre também em áreas rurais, e regiões periurbanas e urbanas (DIAS et al., 2007). As regiões Norte e Nordeste são responsáveis por cerca de 75% dos casos registrados no país (SILVEIRA et al.; 2004).

No estado de Pernambuco, a LTA ocorre em todas as mesorregiões do estado, com predominância na região correspondente à Zona da Mata Atlântica, totalizando cerca de 60% dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO et al., 1999).

Os animais silvestres são considerados importantes reservatórios e/ou hospedeiros naturais das leishmanioses (KRUSE et al., 2004), particularmente roedores, marsupiais, procionídeos, canídeos, primatas, chiroptera e edentados que em muitas situações atuam como hospedeiros naturais (SANTOS et al.;1998; ROTUREAU, 2006).

Dentre os animais silvestres, a espécie *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae), têm sido descrito como importante reservatório silvestre na epidemiologia das Leishmanioses, devido à capacidade de se adaptar a diferentes ambientes e seu comportamento sinantrópico (QUINTAL et al., 2011; SHERLOCK et al., 1988). A constante movimentação deste animal na interface urbano-florestal contribui para sua participação no ciclo peri-domiciliar desse protozoário, expondo a população humana ao risco de infecção (GUERRA, 2007), no entanto, estudos sobre a epidemiologia e o papel desse animal na cadeia de transmissão são escassos.

Tendo em vista a escassez de estudos sobre o papel de *Didelphis albiventris* na transmissão das Leishmanioses, o presente trabalho teve como objetivo a detecção de kDNA de *Leishmania* spp. por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Didelphis albiventris* pertencentes a Mesorregião Metropolitana de Recife e a Microrregião de Araripina estado de Pernambuco, Brasil.

Material e Métodos

Aspectos éticos

Para execução do trabalho, todos os procedimentos foram realizados mediante aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), licença número 103/2015 e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) número 23608-2.

Área de estudo

O estudo foi realizado no período de Março de 2014 a Janeiro de 2015. As coletas foram conduzidas na interface urbano-florestal de Mata Atlântica localizada na Mesorregião Metropolitana de Recife (08° 04' 03''S e 34° 55' 00'' O) e no Bioma Caatinga Localizado na

Microrregião de Araripina (07° 46' 42" S e 39° 56' 28" O), ambos no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil (IBGE, 2015).

Captura dos Animais e coleta de material biológico

Para captura dos animais utilizou-se armadilhas, do tipo *Tomahawk live trap* (dimensões: 0,45x0,21x0,21m), sendo de arame galvanizado, com o desarme do tipo gancho, e estas mantidas à uma distância de 20 metros entre si. Para atração dos marsupiais foram utilizadas iscas como abacaxi e paçoca de amendoim. As armadilhas permaneceram no mesmo local por oito dias, sendo checadas uma vez ao dia, a partir de 5:00 horas da manhã, realizando a troca das iscas diariamente a partir das 17:00 horas, totalizando um esforço de 480 armadilhas/ noites.

Após a captura, os animais foram contidos fisicamente utilizando-se luvas de raspa de couro, submetidos a pesagem e contenção química com a associação de cloridrato de cetamina, na dose de 30 a 50 mg/kg (50 mg/ml; Vetanarcol, König, Santana de Paraiba, Brazil) e cloridrato de xilazina na dose de 2mg/kg (20 mg/ml; Xilazin, Syntec, Brazil) pela via intramuscular (MALTA E LUPPI, 2006), para posterior avaliação clínica.

Todos os animais capturados receberam marcação com tatuagem. Ao término do manejo dos marsupiais, aguardou-se o retorno completo da sedação e posteriormente liberação à vida livre, no mesmo local de onde foram capturados.

As amostras sanguíneas foram colhidas por meio de punção intra-cardíaca com volume variando de 2 a 4 ml de sangue dependendo do peso de cada animal. Após cada punção, as amostras foram depositadas em tubos estéreis com anticoagulante, sendo acondicionados em caixas isotérmicas e encaminhados para o laboratório para posterior procedimento laboratorial.

Exame laboratorial

Reação em Cadeia da Polimerase

DNA do sangue foi extraído a partir de uma amostra de 200 µl utilizando-se o kit de extração “Kit QIAamp Blood and Tissue” seguindo as recomendações do fabricante.

Amplificação do complexo *Leishmania donovani*

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador com ciclos de: 1 ciclo D 94°C – 2 min, e 30 ciclos D 94°C – 20 seg, A 60 °C – 20 seg, E 72°C – 30 seg, E final 72°C – 5 min . Os primers utilizados para a PCR do complexo *L. (L.) donovani* (MC1 e MC2), descritos por CORTES et al. (2004): MC1: (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3') e MC2: (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3'). A utilização desses primers permitem a amplificação de um fragmento de 447 pares de base (pb) do kDNA (DNA do cinetoplasto) da *L. infantum*.

Para todas as PCRs realizadas foram utilizados controles positivos e negativos. O controle positivo consistiu de DNA extraído a partir de medula óssea de cão naturalmente infectado por *L. (L.) infantum*. Já como controle negativo, foi utilizada água ultra-pura.

Amplificação do Complexo *Leishmania braziliensis*

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador com ciclos de: 1 ciclo D 95°C – 5 min, e 35 ciclos D 94°C – 1 min, A 60,5 °C – 1 min, E 72°C – 1 min, E final 72°C – 10min.

Para a reação foram usados os primers B1: (5' – GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG – 3') e B2: (5' – CTA ATT GTG CAC GGG GAG G – 3') segundo Reithinger et al. (2000). A utilização desses primers permitem a amplificação de um fragmento de 750 pares de base (pb) do kDNA (DNA do cinetoplasto) da *L. braziliensis*. Para todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos. O controle positivo consistiu da extração de DNA de amostras de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/1975/M2903) mantidas em meio de cultura. O controle negativo, consistiu de água ultra-pura, a mesma utilizada para preparação da reação.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose à 1% e analisados por meio de um transluminador ultravioleta acoplado a um computador com programa de análise de imagens.

Resultados

Um total de 40 *D. albiventris* (29 fêmeas e 11 machos) foi capturado, dentro dos quais 16 eram filhotes, 13 jovens e 11 adultos, conforme a classificação etária descrita por Macedo et al. (2006). Sendo 10 animais pertencentes à Microrregião de Araripina, e 30 a microrregião de Recife.

Após a realização do diagnóstico molecular, verificou-se que em todas as amostras coletadas não houve amplificação de kDNA de *Leishmania* spp.

Discussão

Após o diagnóstico molecular observou-se que todas as amostras foram negativas. Resultados esses indênticos aos encontrados por Monteiro (2010) e Sandes (2014), que ao pesquisarem amostras de peles do gênero *Didelphis* provenientes da zona da mata, agreste e sertão do estado de Pernambuco pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) não observaram amplificação de kDNA de *Leishmania* spp. E diferem dos resultados descritos por Brandão et al. (2003) e Lima et al. (2013) que reportaram DNA de *Leishmania (L) braziliensis* em *D. albiventris* em diferentes ecótopos do estado de Pernambuco.

Por outro lado, a ausência de amplificação do DNA compatível com o *complexo donovani*, ratificam os resultados encontrados por Lombardi et al. (2014) em Minas Gerais, e Sandes, (2014) em Pernambuco, Brasil, que não observaram a presença de *L. infantum* nas amostras analisadas através da PCR.

Os dados aqui encontrados são discordantes dos achados por Sherlock et al. (1998) na Bahia, Humberg et al. (2012) em Mato Grosso do Sul, Carreira et al. (2012) no Rio de Janeiro, Carvalho (2005) e Lima et al. (2013) em Pernambuco, que usando amostra biológica de sangue, detectaram DNA de *L. infantum* em *Didelphis albiventris*, utilizando a mesma metodologia.

Apesar da não detecção de DNA de *Leishmania* spp. em *D. albiventris* nas regiões estudadas ambas são consideradas áreas endêmicas para *Leishmania* spp. (BRANDÃO-FILHO et al.; 1999; DANTAS e BRANDÃO, 2006; PERNAMBUCO, 2010), o que sugere que outras espécies de animais domésticos ou silvestres possam estar atuando como reservatórios/hospedeiros.

O sinantropismo dessa espécie nas áreas estudadas é um dos possíveis fatores para os resultados negativos, já que algumas espécies de *Lutzomya* em ambiente natural tem uma maior preferência alimentar por galinhas, cavalos, roedores e humanos (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008; FONTELES et al.; 2009), mostrando o oportunismo desses insetos que sugam uma ampla variedade de vertebrados (VELO et al.; 2005).

Outro aspecto relevante para a não detecção de DNA de *Leishmania* spp em *D. albiventris* nas áreas estudadas pode estar relacionada aos baixos níveis de parasitemia exibidos por esses animais (ACOSTA et al., 2014).

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que os *D. albiventris* não participem do ciclo enzootico da *Leishmania* spp. nas localidades estudadas.

Referências Bibliográficas

ACOSTA, I. C. L.; DA COSTA, A. P.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in Wild and Domestic Animals in an Atlantic Rainforest Fragment and Surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.51, n. 3, p. 686–693, 2014.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; CAMPBELL_LENDRUM, D. H.; BRITO, M. E. F.; SHAW, J. J.; DAVIES, C. R.. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.93, p.488–494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; WINTER, L.F.; SHAW, J.J. Wild and synanthropic host of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 97, p. 291– 296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral**. Brasília, DF; 2003. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

CORRÊA, S. H. R.; PASSOS, E. C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa University Press, p. 493–499, 2001.

CARREIRA, J. C.; DA SILVA, A. V.; DE PITA, P. D.; BRAZIL, R. P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.5, p.111, 2012.

CARVALHO, M. R. **Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral Americana na Zona da Mata norte de Pernambuco**. 2005.98f. Dissertação (Mestrado) – Saúde Coletiva. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Pernambuco.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, n. 1, p.12–17, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p. 352–356, 2006.

DIAS, E. S.; SILVA, J. C. F.; SILVA, J. C.; MONTEIRO, E. M.; PAULA, K. M.; GONÇALVES, C. M.; BARATA, R. A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 49–52, 2007.

FONTELES, R. S.; VASCONCELOS, G. C.; AZEVÊDO, P. C. B.; LOPES, G. N.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; KUPPINGER, O.; REBÊLO, J. M. M. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.647–650, 2009.

GUERRA, J. A. O. American tegumentary leishmaniasis in children: epidemiological aspects of cases treated in Manaus, Amazonas, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.9, p. 2215–2223, 2007.

HUMBERG, R. M.; OSHIRO, E. T.; CRUZ MDO, S.; RIBOLLA, P. E.; ALONSO, D. P.; FERREIRA, A. M.; BONAMIGO, R. A.; TASSO, N. JR.; DE OLIVEIRA, A. G. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in na urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, n.3, p. 2–470, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (IBGE) **Geociências**. Disponível:< Estimativa Populacional 2012Censo Populacional 2011 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (outubro de 2013). >.acesso 15/009/2015.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A. M.; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infectious. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n.12, p. 2067–2072 2004.

LIMA, B. S.; DANTAS-TORRES, F.; DE CARVALHO, M. R.; MARINHO-JUNIOR, J. F.; DE ALMEIDA, E. L.; BRITO, M. E. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, p. 592–597, 2013.

LOMBARDI, M. C.;TURCHETTI, A. P.; TINOCO, H. P.; PESSANHA A. T.; SOAVE, S. A.; MALTA, M. C. C.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p.243–1246, 2014.

MACEDO, J.; LORETTO, D.; VIEIRA, M. V.; CERQUEIRA, R. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. **Mastozoología Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 133–136, 2006.

MALTA, M. C. C.; LUPPI, M. M. Marsupialia-Didelphimorphia (gambá, cuíca). In: ZALMIR, S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006; Cap. 23, p. 340–357.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 41–45, 2004.

MONTEIRO, S. R. D. **Participação dos gambás na Epidemiologia da Leishmaniose na Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil**. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, Pe.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y, N.; MORAES, J. L. P, LOROSA, E. L, RÊBELO, J. M. M. Preferência alimentar sanguínea de flebotômíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2183–2186, 2008.

PERNAMBUCO. GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. **Análise de Situação em Saúde da Microrregião de Ouricuri em Pernambuco** / Governo do Estado de Pernambuco, 2009. 161 p.

QUINTAL, A. P; RIBEIRO EDE, S; RODRIGUES, F. P; ROCHA, F. S; FLOETER-WINTER, L. M; NUNES, C. M. *Leishmania spp.* in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, n. 2-3, p. 9–112, 2011.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D C.; DAVIES, C R. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.2, p.748–751, 2000.

ROTUREAU, B. Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 81–96, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21–25, 2007.

SANDES, H. M. M. **Detecção molecular de *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi* em mamíferos selvagens de vida livre.** 2014. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de medicina Veterinária, Recife, Pe.

DOS SANTOS, S, O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA HOFFMANN, M.; DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315–317, 1998.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JR. G. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia.VI – Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 1, p. 23–27, 1988.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

VELO, E.; PAPARISTO, A.; BONGIORNO, G.; MUCCIO, T.; KHOURY, C.; BINO, S.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; MAROLI, M. Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. **Parasite**, v. 12, p.45– 49, 2005.

WHO. World Health Organization. Urbanization: na increasing risk factor for leishmaniasis. Weekly **Epidemiological Record**, v.77, n.44, p. 365–372, 2002.

Artigo 3

Ticks in *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) from the Northeastern region of Brazil

Ticks in *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) from the Northeastern region of Brazil

Abstract

Several tick species belonging to the Ixodidae family parasitize wild mammals such as marsupials. In this study, different species of ticks were reported infesting marsupials (*Didelphis albiventris*) that were caught in a fragment of Atlantic Forest located in the northeastern region of Brazil. These animals (n = 40) were caught over a one-year period using Tomahawk live traps. They were physically examined; ticks were collected from them and were stored until morphological identification. The ticks were identified as *Ixodes loricatus*, *Amblyomma rotundatum* and *Amblyomma* spp. This study reports on the ixodid fauna of marsupials living in a fragment of Atlantic Forest in the northeastern region of Brazil. In addition, for the first time, *A. rotundatum* was reported infesting *D. albiventris*.

Key words: Ixodids, Marsupials, Brazil, Biology

Resumo

Várias espécies de carrapatos pertencentes à família Ixodidae parasitam mamíferos selvagens, como os marsupiais. Neste estudo, diferentes espécies de carrapatos foram relatadas parasitando marsupiais (*Didelphis albiventris*) que foram capturados em um fragmento de Mata Atlântica, localizada na região Nordeste do Brasil. Estes animais (n = 40) foram capturados durante o período de um ano usando armadilhas Tomahawk live traps. Todos os animais foram fisicamente examinados, carrapatos foram coletados, armazenados e identificados morfologicamente. Os carrapatos identificados foram *Ixodes loricatus*, *Amblyomma rotundatum* e *Amblyomma* spp. Este estudo relata a fauna ixodídea de marsupiais que vivem em um fragmento de Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil. Além disso, pela primeira vez, *A. rotundatum* foi relatado parasitando *D. albiventris*.

Palavras-chave: Ixodídeos, Marsupiais, Brasil, Biologia

Introduction

Ticks are important ectoparasites distributed throughout the world. They present great importance in veterinary medicine since they are vectors for pathogens such as viruses, bacteria, protozoa and nematodes (GUIMARÃES et al., 2001; DURDEN e KEIRANS, 1996). It is important to note that some pathogens transmitted by ticks are of medical and veterinary concern. For example, *Rickettsia rickettsii* which has been isolated from some tick species, is the causative agent of Rocky Mountain spotted fever (HOSKINS, 1991).

These arthropods belong to three distinct families (Argasidae, Nuttallidae and Ixodidae), but most of the specimens are classified in the Ixodidae family and parasitize wild animals (LABRUNA, 2004). Among these animals, rodents (e.g. *Akodon cursor*) and marsupials (e.g. *Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita* and *Philander opossum*) have frequently been reported to be infested by ticks (ARAGÃO, 1936; EVANS et al., 2000; MULLER et al., 2005).

Several tick species do not present risks to humans because they are associated with specific hosts in the natural environment. However, these arthropods are distributed across large areas and wild animals frequently play an important role in the spread of the tick population (SILVA et al., 2008).

Indeed, knowledge of the ixodid fauna in marsupials is extremely important because of the risks that these ticks may present to animals, including humans. Therefore, the aim of this study was to report on the main tick species infesting marsupials in the northeastern region of Brazil.

Material and Methods

Ethical aspects

All procedures herein performed were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (license number 103/2015), and the System Authorization and Information on Biodiversity (Sisbio) (license number 23608-2).

Study area

This study was conducted from March 2014 to January 2015, in two fragments of Atlantic Forest located in the Recife metropolitan region (Pernambuco State, North-eastern Brazil) (8 ° 04'03 " S and 34 ° 55'00 " W), the follows: Parque Estadual de Dois Irmãos e Mata de Aldeia/Chã da Peroba (Aldeia). The study area has a humid coastal climate, with an average annual temperature of 25.5 ° C (ranging from 23.9 ° C to 26.6 ° C) (IBGE, 2015).

Animals and tick sampling

Tomahawk live traps were used to catch the marsupials. A total of 60 traps were used, thus representing capture effort of 16,600 traps/collection over the entire study period. Fruits (pineapple) were used as bait.

The animals were anesthetized using a combination of ketamine (30 mg/kg) and xylazine chloride (2 mg/kg) (MALTA e LUPPI, 2006). They were then physically examined and were searched for ticks over a five-minute period. Specimens were removed with the aid of tweezers and then stored in 70% alcohol until the time of making morphological identification. All the ticks were identified using morphological keys (ARAGÃO e FONSECA, 1961; BARROS-BATTESTI et al., 2006). After total recovery, all the marsupials were released in the same place where they had been caught.

Results

A total of 40 individuals of *Didelphis albiventris* (29 females and 11 males) were caught in this study. Among the 40 animals examined, 25% (10/40) were infested by ticks. A total of 24 non-engorged ticks (mean = 2.4; minimum = 2; and maximum = 5) were collected, comprising 11 females, three males, six nymphs and four larvae. The ticks were identified morphologically as *Ixodes loricatus* (nine females and three males), *Amblyomma rotundatum* (two females) and *Amblyomma* spp. (six nymphs and four larvae).

The species *I. loricatus* was characterized by the presence of a short external spine on coxa I, with slightly rounded tip, and not exceeding coxa II. Furthermore, absence of lobes in the ventral base of the gnathosoma and hypostome was observed, with well-defined denticles in males. Conversely, females had short external spines on coxa I, with slightly rounded edges, and short and robust pedipalps and hypostome (ONOFRIO, 2003). On the other hand, the species *A. rotundatum* was characterized by the presence of a light brown scutum, ornamented with soft spots on the lateral and central region (GUIMARÃES et al., 2001).

Discussion

This study describes the main tick species parasitizing marsupials that were caught in a fragment of Atlantic Forest located in the northeastern region of Brazil. Moreover, it is important to note that, for the first time, parasitism by *A. rotundatum* in *D. albiventris* has been described here.

Interestingly, all the marsupials used here were of the species *D. albiventris*. It is most likely that the presence of this marsupial species alone is related to its behavior. It is known that some species are strictly correlated with forested areas, such as *Didelphis aurita*, a species commonly found in this study area. On the other hand, *D. albiventris* is well adapted to urban areas and uses

forested areas to move between different urban areas. This behavior facilitates its migration and adaptation to urban areas (CÁCERES e MONTEIRO-FILHO, 2006).

Most of the tick specimens identified here were of the species *I. loricatus* (n = 12). This species has been considered to be one the most common ectoparasites that infests *D. albiventris* in the northeastern region of Brazil (FONSECA, 1957/1958). Recently, a study conducted in the state of Pernambuco (northeastern region of Brazil) detected *I. loricatus* in this marsupial species (DANTAS-TORRES et al., 2012). In addition, this same parasitism has been observed in other regions of Brazil, such as the southern (MULLER et al., 2005), southeastern (BRROS-BATTESTI e Knysak, 1999) and central-western regions (MIZIARIA et al., 2008).

The predominance of adults forms of *I. loricatus* found here corroborates previous studies (MULLER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014). In fact, this tick species has as main host wild rodents during the larva and nymph stages and different species of marsupials during the adult stage. It is important to highlight that the occurrence of this species parasitizing *D. albiventris* deserves attention, especially considering the spreading of pathogens. Indeed, it is known that some pathogens of medical and veterinary concern (e.g., *Borrelia burgdorferi* causative agent of Lyme-like disease) have been isolated in *I. loricatus*, as well as their marsupial hosts (ABEL et al., 2000; MULLER et al., 2005).

Curiously, larvae and nymphs of *Amblyomma* spp. were detected in this study. Although it has been demonstrated that occurrences of these stages is more common in birds than in mammals (GUGLIELMONE et al., 2003), some studies have reported this type of parasitism in marsupials (BARROS e BAGGIO, 1992; MULLER et al., 2005).

The presence of *A. rotundatum* infesting *D. albiventris* was registered for the first time in this study. Until now, only a few reports of the presence of adults of this species parasitizing warm-blood animals have been published worldwide. For example, there have been some of occurrences in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), armadillo (*Dasypus novemcinctus*), anteater (*Tamandua tetradactyla*) (FLOCH e FAURAN, 1958) and humans (*Homo sapiens*) (FREIRE et al., 1995). Recently, this tick species was reported infesting migratory birds such as the North American thrush (*Catharus fuscescens*). This event is considered to be an important factor for the dispersion of this ixodid species (SCOTT e DURDEN, 2015).

Parasitism due to *A. rotundatum* is a common finding in ectodermic animals (e.g. amphibians and reptiles) (ARAGÃO, 1936; ANTONUCCI et al., 2012). However, its occurrence in *D. albiventris*, which was registered for the first time in the present study, is unusual. It is known that parasitism due to this tick species in warm or cold-blood animals is not frequently reported (BOTELHO et al., 2002). However, existence of this parasitism among some species of the genus *Amblyomma* (AMORIM et al., 1999) demonstrates these arthropods' evolution and ability to adapt to different hosts (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1980). In addition, some ecological factors, such as environmental changes may interfere with the specificity of some ectoparasites to different hosts (GETTINGER e ERNEST, 1995).

In conclusion, this study describes the ixodid fauna of marsupials that were caught in a fragment of Atlantic Forest located in the northeastern region of Brazil. In addition, for the first time, parasitism due to *A. rotundatum* in *D. albiventris* has been reported. The findings of this study emphasize the importance of these synanthropic animals in relation to dispersion of different tick species, since they have free movement between wild and urban areas.

References

- ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, H. H.; SCHUMAKER, T. T. S. *Borrelia*-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia Country, State of São Paulo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , v.95, n.5, 621–624, 2000.
- AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M. Chave dicotômica para identificação de larvas de algumas espécies do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Entomología y Vectores**, v;6,n.1, 75–90, 1999.
- ANTONUCCI, A. M.; MARCANTONIO, A. S.; FRANÇA, F. M.; PEREIRA, J. R. Ocorrência de *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) em *Bufo ictericus* Spix, 1824 (*Rhinella icterica*) (Anura: Bufonidae) no Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. **Natureza on line**, v.10, n. 1, p. 5–6, 2012.
- ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VXXX. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, n.2, p.115–148, 1961.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759–843, 1936.

BARROS, D. M.; BAGGIO, D. Ectoparasites Ixodida Leach, 1817 on Wild Mammals in the State of Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.2, p.291-296, 1992.

BARROS-BATTESTI, D. N.; ARZUA, M.; BECHARA, J.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. p. 223.

BARROS-BATTESTI, D. M.; YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; GOMES, A. C. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on small wild animals from the Atlantic Forest in State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.37, n.6, p.820–827, 2000.

BARROS-BATTESTI, D. M.; KNYSACK, I. Catalogue of The Brazilian Ixodes (Acari: Ixodidae) material in the Mite Collection of Instituto Butantan, São Paulo,Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 41, n.3, p. 49–57, 1999.

BOTELHO, M. C. N.; LEITE, L. M. R. M.; BASTOS, I. P.; SILVA, L. A. M.; CAMPELLO, M. . L. C. B.; AGUIAR, M. C. A.; SERRA-FREIRE, N. M, OLIVEIRA. J. B. *Amblyomma dissimile* Koch 1844 (Acari: Ixodidae) em mamíferos silvestres no Estado de Pernambuco, Brasil. **Entomología y Vectores**, v. 9, n.1, p. 71–78, 2002.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Uso do Espaço por Marsupiais: Fatores Influentes, Comportamento e Heterogeneidade Espacial. In: CÁCERES, N.C.; MONTEIRO-FILHO, E.L A. **Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução**. (eds). Mato Grosso do Sul Federal University Press, Campo Grande; 2006.p.203–215.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. I. **Microecologia**. São Paulo: EPU, 1980. p. 58.

DANTAS – TORRES, F.; ALÉSSIO, F. M.; SIQUEIRA, D. B.; MAUFFREY, J. F.; MARVULO, M. F. V.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; LABRUNA, M. B.; SILVA, J. C. R. Exposure of small mammals to ticks and rickettsiae in Atlantic Forest patches in the metropolitan area of Recife, North-eastern Brazil. **Parasitology**, v. 139, 83–91, 2012.

DURDEN, L. A.; KEIRANS, J. E. **Nymphs of the Genus Ixodes (Acari: Ixodidae) of the United States: Taxonomy, Identification key, Distribution, Hosts and Medical Veterinary Importance.** Entomological Society of America. Maryland: Lanham; 1996. p. 95.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMO, A. A. A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographic distribution - I The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p. 453–470, 2000.

FONSECA, F. Inquérito sobre a fauna acarológica de parasitas no nordeste do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v.8, p.99-186, 1957/8.

FREIRE, N. M. S.; PERALTA, A. S.L.; TEIXEIRA, R. H. F.; GAZETA, G. S.; AMORIM, M. *Amblyomma rotundatum* parasitando *Homo Sapiens* no parque zoobotânico do MPEG em Itaboraí. In: **XIX Congresso Brasileiro de Zoológico. Foz do Iguaçu**: Arquivo SZB; 1995. P. 20.

FLOCH, H.; FAURAN, P. Ixodides de la Guyane et des Antilles Francaises. **Archives de l'Institut Pasteur de la Guyane Francaise**, v. 19, n. 446, p.1–94, 1958.

GETTINGER, D.; ERNEST, K. A. Small-mammal community structure and the specificity of ectoparasite associations in Central Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.55, n.2, p.331–341, 1995.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical Zoogeographic Region.** Netherlands: ICTTD-2; 2003. p. 173.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária.** São Paulo: Pleiade, FAPESP; 2001. p. 218.

HOSKINS, J.D. Tick-borne zoonoses: Lyme disease, ehrlichiosis, and Rock Mountain spotted fever. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v.6, n.3, p. 236–243, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (IBGE) **Geociências.** Available at http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/lixo_coletado/lixo

coletado110.shtm.

LABRUNA, M. B. Carrapatos. **A Hora Veterinária**, v.23, n.137, p. 63–65, 2004.

MALTA, M. C. C.; LUPPI, M. M. Marsupialia - Didelmorphia (Gambá, Cuíca). In CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca: 2006. p. 340–357.

MIZIARA, S. R.; PAIVA, F.; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; LOPES, V. A.; PONTES, N. T.; BITENCOURT, K. Ocorrência de *Ixodes loricatus* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) parasitando *Didelphis albiventris* Lund, 1841, (Didelphimorphia: Didelphidae), em Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n.3, p.158–160, 2008.

MULLER, G.; BRUM, J. G. W.; LANGONE, P. Q.; MICHELS, G. H.; SINKOC, A. L.; RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. *Didelphis albiventris* (Lund, 1841), parasitado por *Ixodes loricatus* Neuman, 1899 e *Amblyomma aureolatum* Pallas, 1772 (Acari: Ixodidae) no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p. 319–324, 2005.

OLIVEIRA, H. H.; GOMES, V.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S.; SERRA-FREIRE, N. M.; QUINELATO, I. P. F.; MORELLI-AMARAL, V. F.; ALMEIDA, A.B.; CARVALHO, R.W.; CARVALHO, A.G. Diversidade de ixodida em roedores e marsupiais capturados no Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.4, p.1097–1104, 2014.

ONOFRIO, V. C. O gênero *Ixodes* Latreille, 1795 (Acari: Ixodidae) no Brasil: Distribuição geográfica, hospedeiros, toxonomia e chave de identificação para as espécies, In. Barros-Battesti, D. M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. **Carrapatos de Importância Médico- Veterinário da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies** 1.ed . São Paulo: Vox/CTTD-3/Butantan; 2003. p. 45–50.

SCOTT, J. D.; DURDEN, L. D. First record of *Amblyomma rotundatum* tick (Acari: Ixodidae) parasitizing a bird collected in Canada. **Systematic and Applied Acarology**, v.20, n.2, p.155-161, 2015.

SILVA, B. S. F.; TERASSINI, F. A.; CORAGEM, J. T.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. Observação e caracterização da altura de carrapatos em arbustos do parque natural municipal de Porto Velho, Amazônia Ocidental – RO. **Saber Científico**, v.1, n.1, p. 118–131, 2008.