



## La fauna silvestre atropellada como recurso para estudios de patógenos. Una revisión bibliográfica

### *Roadkill wildlife as a resource for pathogen studies. A literature review*

Sergio E. Bermúdez C.,<sup>1</sup> Joao Varela-Petrucci,<sup>2</sup> Víctor M. Montenegro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Investigación en Entomología Médica, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ciudad de Panamá, Panamá.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular, Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Ciudad de Panamá, Panamá.

<sup>3</sup>Laboratorio de Parasitología, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Correspondencia: Sergio Bermudez, Avenida Justo Arosemena y Calle 35, Panamá. |sbermudez@gorgas.gob.pa. | ORCID: 0000-0003-1830-3133

Recibido 27/10/2022 – Aceptado 11/08/2023

**Resumen:** La fauna silvestre puede ser reservorio de numerosos patógenos que pueden poseer importancia zoonótica; sin embargo, debido a las dificultades en la captura y manejo de estos animales, en muchas ocasiones se hace complicado obtener muestras para analizar. En este trabajo se presentan ejemplos citados de la literatura sobre cómo las carcasas de animales silvestres atropellados, pueden ser una alternativa para la colecta de muestras de tejidos o de ectoparásitos que permitan la detección de patógenos, incluyendo su debida manipulación y preservación para obtención de estos datos.

**Palabras clave:** fauna silvestre atropellada, parásitos, patógenos, vigilancia pasiva, centinelas, zoonosis

**Summary:** Wild fauna could be reservoir for numerous pathogens that may have zoonotic importance; however, due to the difficulties in capturing and handling these animals, it is often difficult to obtain samples for analysis. In this work, examples are presented of how the carcasses of run-over wild animals can be an alternative for the collection of samples that allow the detection of pathogens.

**Keywords:** roadkill wildlife, parasites, pathogens, passive surveillance, sentinels, zoonoses

### Introducción

A nivel mundial se estima que millones de animales silvestres mueren cada año a causa del tránsito vehicular, lo que impacta en las poblaciones de las especies involucradas, principalmente a aquellas que se encuentran amenazadas o son más vulnerables (Borda-de-Água et al., 2014; Medrano-Vizcaíno et al., 2021). Además de las posibles consecuencias ecológicas, este tipo de accidentes tienen un impacto negativo en los seres humanos, ya sea por las pérdidas económicas en los vehículos o por las consecuencias en la salud de los conductores y pasajeros, las cuales pueden ser desde lesiones leves graves hasta la muerte (Williams y Wells, 2005; Morelle et al., 2013). Sin embargo, más allá de representar aspectos negativos desde el punto de vista de la conservación y para la economía de los propietarios de los autos, estas carcasas pueden ser utilizados con fines científicos.

Inicialmente, estudiar los patrones del movimiento de animales dentro de las áreas de accidentes podría facilitar el seguimiento de los eventos y permitir medidas de gestión que prevengan o minimicen otros atropellos a la fauna silvestre (Borda-de-Água et al., 2014; Ceia-Hasse et al, 2017). Esto también puede proporcionar información sobre cuáles son las especies que habitan un área, sus movimientos, distribución, comportamiento, dieta o incluso la presencia de especies raras o nuevas (Gottdenker et al., 2001; Reid y Koch, 2017; Schwarz et al., 2020). Por otra parte, las carcasas de fauna silvestre atropellada aportan información biológica útil, ya que la extracción de tejidos adecuados o pieles puede ser utilizada en estudios genéticos, además, pueden



proporcionar información sobre la presencia de parásitos o patógenos que circulan en estos animales (Ryhan & Spraker, 2010; Muñoz-García et al., 2019; Schwarz et al., 2020; da Costa et al. 2022). En este sentido, las carcasas de animales atropellados podrían verse como una oportunidad para acceder a material biológico de especies que rara vez se capturan, servir para establecer programas de vigilancia epidemiológica y/o zoonótica pasiva, entre otros (Gottdenker et al., 2001; Richini-Pereira et al., 2010; dos Santos et al., 2021; Aguilar-Vargas et al., 2022).

A pesar de lo anterior, la toma de muestras puede representar un reto en el ámbito de la manipulación de tejidos potencialmente infectados, al igual que la descomposición, por lo que se deben tomar ciertos cuidados en la recolección, dependiendo del objetivo del estudio para el que se muestrea. En esta revisión se abordarán temas de seguridad, muestreo de ectoparásitos, tejidos y sangre para análisis molecular de patógenos o filogenéticos.

### **Bioseguridad y toma de muestras de carcasas de fauna silvestre atropellada**

Hay muchos factores que influyen en los atropellos de la fauna silvestre, p. e. factores relacionados con la cobertura vegetal, la fragmentación de bosques o la pérdida de hábitat; comportamientos asociados al conductor, velocidad, flujo vehicular, estado del auto y vías; comportamiento intrínseco de las especies animales (White & Dusek, 2015; Ceia-Hasse et al., 2017; Aguilar-Vargas et al., 2022). Aunado a lo anterior, otros factores podrían afectar el comportamiento normal de los animales, por ejemplo, presencia de patógenos no reconocidos en animales silvestres (Woodford, 2000; Ryser-Degeorgis, 2013; Aguilar-Vargas et al., 2022). En estas condiciones, se recomienda adoptar medidas de bioseguridad para garantizar la salud del personal. Entre las medidas básicas de protección está el uso de guantes y mascarillas desechables, útiles tanto para levantar la carcasa de la carretera y transportarlo al laboratorio, como para tomar las muestras *in situ*. En otros casos se podrían utilizar batas desechables y protección ocular. Las carcasas también pueden ser transportadas al laboratorio, siempre y cuando se tengan en cuenta varios factores para garantizar que el material no contamine el vehículo, como el uso de contenedores especiales o bolsas de almacenamiento de material biológico. Actualmente existen protocolos para el transporte de carcasas de fauna doméstica y silvestre, los cuales se recomienda revisar (Woodford, 2000). Si no se dispone de contenedores adecuados para garantizar la bioseguridad, es mejor tomar muestras en el sitio. Otro punto que debe ser considerado, es la emisión de un informe o resultados obtenidos del cadáver, foto-documentación de la carcasa y sus alrededores, al igual que la utilización de dispositivos para marcar la ubicación de donde ocurrió el atropello, lo que brindará datos de la población silvestre de esa zona (Fidino et al., 2022). Como principio inicial, la bioseguridad siempre debe considerarse desde la toma de la muestra, sea *in situ* o en el laboratorio, para garantizar la integridad de la muestra, y la salud del personal (Tabla 1).

Finalmente, no solo se debe procurar la toma adecuada de la muestra y su llegada al laboratorio, -sea un segmento o la carcasa entera-, sino también se deben tomar precauciones para evitar otros accidentes de tráfico asociados con la manipulación de las carcasas.

**Tabla 1:** Equipo necesario para toma de muestra de carcasas de fauna silvestre atropellada (adoptado de Sánchez, 1990).

Equipo de Protección personal (EPP)	Equipo para toma de muestras
Overol desechable.	Tubos con EDTA para toma de muestras de sangre o coágulos.
Delantal impermeable.	Tubos de 50 mL o envases de mayor tamaño con formol 10% tamponado para histopatología.
Gafas.	Tubos de 15 o 50 mL con preservantes de ácidos nucleicos (RNA Later o solución a base de sales de zinc) para muestras para PCR.
Mascarillas.	Tubos con etanol 70% grado molecular, para análisis entomológico.
Guantes con malla de acero.	Equipo básico de necropsia (hacha, cuchillo, bisturí, pinzas para tejidos, tijeras).
Guantes de nitrilo-neoprex.	Envase para descarte de objetos punzocortantes.
Botas impermeables.	Jeringas de diversos volúmenes, con agujas de diversos calibres.
Lona y caja hecha de material a prueba de derrames (en caso se decida transportar la carcasa).	Portálaminas para citologías.
Desinfectantes (virkon, hipoclorito de sodio, alcohol 70% desnaturalizado).	Tarjetas FTA para realizar impronta de tejidos o manchas de sangre / coágulos.
	Bolsas con cierre hermético para evitar el derrame de tubos con contenidos líquidos.
	Hielera o envase hermético con bolsas o elementos enfriantes (gel pack) para transporte en frío de muestras para cultivo.

## Muestras y análisis

Es importante reconocer que la integridad de las muestras dependerá del tiempo de descomposición del animal. Por ejemplo, animales que no presenten signos avanzados de descomposición, como olor fuerte o a descompuesto e hinchazón por llenado de gases en cavidad u órganos abdominales; que no muestren signos visibles de haber sido extensivamente depredado por animales carroñeros; que no hayan sido extensamente colonizado por hongos o bacterias, puede ser considerado para su estudio *in situ*, o, dependiendo de la capacidad, ser transportado al laboratorio bajo las condiciones de bioseguridad anteriormente mencionadas. Signos como los anteriores son indicadores de una carcasa en mal estado y consecuentemente, no apta para estudios de vigilancia epidemiológica o zoonótica pasiva (Brooks, 2016). Es importante considerar que la descomposición del animal estará regida principalmente por el tipo de clima, el grado de exposición al sol y presencia de otros organismos que puedan alimentarse del cadáver o colonizarlos.

Consecuentemente, los animales eviscerados o en estado avanzado de descomposición no deben ser considerados para la extracción de muestras de tejidos u órganos, ya que el tejido puede estar altamente deteriorado para realizar estudios histopatológicos, al igual que los ácidos nucleicos de los posibles patógenos que colonizan estos órganos. En estos casos, la colecta de ectoparásitos puede ser mejor indicada.

## Moscas, ectoparásitos y comensales

Los vertebrados mantienen asociaciones con diferentes grupos de invertebrados externos, ya sean verdaderos ectoparásitos que se alimentan de la sangre de sus hospedadores, o comensales que viven en la piel, plumas, pelo o escamas. Los verdaderos ectoparásitos incluyen sanguijuelas, insectos (piojos, pulgas, moscas y escarabajos) y arácnidos (ácaros y garrapatas); mientras que los comensales incluyen grupos altamente especializados de ácaros (p. ej., ácaros de las plumas) o insectos (p. ej., polillas *Pyralidae* de la subfamilia *Chrysau-ginae*, o escarabajos *Amblyopinus*) (Waage y Montgomery, 1976; Delgado, 2012). Otro grupo especial de ectoparásitos son los tórnsalos (familia *Cuterebridae* s.l.) que se encuentran dentro de la piel (Ruiz et al., 1993). Además, en familias de *Diptera* como *Calliphoridae*, *Sarcophagidae* o *Muscidae*, algunas especies son parásitos que se alimentan de tejidos de vertebrados vivos, las cuales no deben confundirse con especies de esas mismas familias que se sienten atraídas por los cuerpos en descomposición, si se trata de una miasis activa antes de la

muerte. De ser posible, se deben utilizar pinzas entomológicas para la extracción de los ectoparásitos, y de un medio de preservación adecuado, como el etanol 96% de grado puro, es importante para el transporte de estos especímenes para su debida identificación en el laboratorio de entomología (Anónimo 2000). En el caso de las moscas, deben ser sacrificadas en agua caliente y luego en etanol o se pueden llevar vivas al laboratorio y colocarlas en una cámara de cría con carne y obtener los adultos.

La recolección de ectoparásitos o comensales es importante para aumentar el conocimiento sobre las poblaciones locales, en particular en especies raras de vertebrados. Dependiendo de la especie de ectoparásitos, algunos grupos dejan las carcasas poco después de la muerte (p. ej., pulgas), mientras que otros permanecen más tiempo (garrapatas). Por otro lado, mientras que las garrapatas o ácaros Laelapidae son muy fáciles de visualizar en la piel, ácaros de las superfamilias Dermanyssoidea o Analgoidea son más difíciles de observar en las carcasas en el campo. En términos generales, los ectoparásitos deben ser preservados en etanol puro 70-96% para identificación morfológica (Arzúa y Brescovit, 2006). También se puede considerar conservarlos en soluciones estabilizadoras hipertónicas, como el RNA Later, o soluciones a base de sales de zinc, las cuales pueden precipitar proteínas sin alterar la conformación de moléculas de ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt), el cual es útil para estudios filogenéticos y para la detección de patógenos (Santolin et al., 2013; Varela, 2016, Campana et al., 2016). Además, garrapatas ingurgitadas pueden mantenerse vivas para obtener huevos (en caso de hembras) y ninfas y adultos (en caso de larvas y ninfas, respectivamente) (Arzúa y Brescovit, 2006; Bermúdez et al., 2015).

Los ectoparásitos hematófagos como garrapatas, pulgas y piojos, son vectores relevantes de varios grupos de patógenos, entre ellos bacterias de los géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Borrelia*, *Yersinia*, *Bartonella* o *Francisella*; protozoarios como *Babesia* o *Hepatozoon*; y diferentes familias de virus que causan fiebres hemorrágicas o encefalitis (Guimaraes et al., 2021, Charles et al. 2022). Por lo tanto, las carcasas de animales atropellados no solo brindan datos sobre la relación ectoparásitos-hospedero, sino que también pueden aportar información sobre los patógenos y otros microorganismos asociados a estos artrópodos (Oteo et al., 2014). De hecho, se han desarrollado artículos recientes sobre enfermedades transmitidas por garrapatas utilizando garrapatas recolectadas en carcasas (Spolidorio et al., 2012; Bermúdez et al., 2021; Calchi et al., 2020; Hirunkanokpun et al., 2022).

En el caso de virus transmitidos por garrapatas, dado que algunos virus de ácido ribonucleico (ARN) deben conservarse a bajas temperaturas, es preferible no conservar las garrapatas en etanol, sino mantenerlas vivas hasta que se extraiga el ARN. De igual forma, para aumentar la carga bacteriana para cultivar ciertas especies bacterianas, las garrapatas deben mantenerse vivas y seguir protocolos establecidos para cada grupo de patógenos (Oteo et al., 2014).

## Endoparásitos

El término "endoparásito" abarca un grupo amplio y diverso de parásitos que viven dentro de sus hospederos, ya sea intracelularmente (p. ej., células sanguíneas) o extracelularmente, en este último caso afectando varios tipos de tejidos u órganos enteros; por ejemplo, la *Fasciola* spp. en cérvidos (Gomez-Puerta et al., 2016) y nemátodos como *Bailysascaris* spp. en mapaches (Lombardo et al., 2022) son conocidos parásitos internos de fauna silvestre que pueden ser evidenciados en las carcasas. El origen de la infestación en los hospederos varía según los grupos de endoparásitos, ya que puede ser mediada por un vector (p. ej., *Babesia* spp., *Plasmodium* spp.), vía consumo de agua (*Gnathostoma* spp.), o por ingestión (*Hepatozoon* spp.) (Flynn, 1973; Guimaraes et al., 2001; Mehlhorn, 2016). En varias especies, los ciclos de vida pueden ser complejos, involucrando hospederos intermedios y definitivos. Además, se pueden encontrar diferentes etapas como formas inmaduras, adultos, huevos o quistes en diferentes órganos.

Para evaluar los endoparásitos de los animales atropellados, se deben transportar las carcasas al laboratorio, preferentemente animales con bajo grado de descomposición y no eviscerados. En el laboratorio, la necropsia puede revelar la presencia de helmintos en los órganos (Aguilar-Vargas et al., 2022); de prepararse secciones histológicas de tejidos, se puede evidenciar la presencia de quistes, en especial patógenos de importancia zoonótica como *Sarcocystis* o *Toxoplasma* (Robertson et al., 2019; Reisfeld et al., 2019; dos Santos et al., 2022). En algunos casos se pueden recolectar heces, las cuales pueden brindar información sobre la presencia de helmintos o protozoos, o pueden ser utilizadas para cultivos de heces.

Debido a la variedad de microorganismos que se consideran endoparásitos, además de la variedad de formas que se pueden encontrar, para la identificación se deben aplicar diferentes procedimientos de conservación y fijación de las muestras; entre ellos está transporte de muestras en frío; o fijación de heces para observación de

estructuras (huevos) de helmintos, utilizando formol al 10% tamponado (ver Castro y Guerrero, 2001; dos Santos et al., 2021).

## Tejidos y sangre

Los tejidos de animales atropellados (p.e. hígado, riñón, bazo, pulmón, cerebro, sangre, y piel) pueden contener información sobre la ecología de patógenos o agentes potencialmente zoonóticos que circulan en la fauna silvestre (Rodríguez-Castro et al., 2017; Richini-Pereira et al., 2010; Fleer et al., 2014). No obstante, como se ha explicado anteriormente, este tipo de muestra es muy susceptible a la descomposición, en especial en el trópico donde la abundancia de hongos y bacterias, la alta humedad y temperaturas, pueden acelerar la degradación de tejidos y órganos. Además, la presencia de carroñeros puede dejar un pequeño margen de tiempo para que un tejido u órgano sea recuperable (Mazur-Panasiuk y Woźniakowski, 2020; Sorensen et al., 2016). Consecuentemente, la colecta de este tipo de muestra dependerá en gran medida del grado de su degeneración.

Existen algunos ejemplos de qué tipo de microorganismo puede ser detectado en carcasas de animales silvestres, lo cual es evidenciable en los hallazgos en animales vivos. En este sentido, Aguilar-Vargas et al. (2022), hacen un completo análisis sobre patologías encontradas en necropsias de animales atropellados en Costa Rica, además de una amplia lista de parásitos nemátodos, tremátodos, cestodos, acantocéfalos, además de bacterias de interés sanitario como *Staphylococcus aureus* o protistos como *Trypanosoma cruzi*. Por otro lado, *Mycobacterium bovis*, un potencial agente zoonótico conocido fauna silvestre, se ha encontrado en mustélidos, principalmente en tejones (*Meles meles*) y mapaches (*Procyon lotor*) en Reino Unido y Estados Unidos (Delahay et al., 2007; Szekeres et al., 2019). Hallazgos de este tipo son importante, considerando que ambas especies son frecuentemente objeto de accidentes viales, además de ser animales sinantrópicos.

Por otro lado, la información de sangre o tejidos puede ser complementaria a los microorganismos detectados de los ectoparásitos colectados de las carcasas. En este sentido, patógenos asociados a ectoparásitos pueden ser detectados molecularmente o aislados a partir de muestras de sangre o de tejidos como bazo, hígado o riñones, en diversos grupos de vertebrados, especialmente mamíferos (Millán et al., 2015; Soraes et al., 2017; Szekeres et al., 2018). Esto ha conllevado al reportes de bacterias de la familia Anaplasmaceae (Ebani et al., 2011), *Rickettsia* (Szabó et al., 2019), *Borrelia* (Szekeres et al., 2018), o hemoparásitos como *Hepatozoon*, *Babesia*, *Theileria* (Carvalo et al., 2021), incluso el reconocimiento de nuevas cepas o especies patógenos como *Theileria terrestris* (Mongruel et al., 2022).

De los órganos frescos y reconocibles pueden tomarse muestras para histopatología y almacenarse en formalina tamponada al 10%; sin embargo, se pueden realizar más estudios sobre las carcasas para evaluar el grado o la extensión de la reducción de la calidad del ADN. Para pruebas moleculares, el tejido se puede almacenar en soluciones estabilizadoras, como RNA Later, o soluciones a base de sales de zinc (Lykidis et al., 2007) para transportarlo al laboratorio donde se analizará. Del material colectado, se puede extraer material genético de agentes fúngicos, como hongos de los géneros *Amauroascus*, *Metarhizium*, *Aspergillus*, *Emmonsia*, *Paracoccidioides* y *Pichia*, (Richini-Pereira et al., 2010), o de organismos rickettsiales, como *Ehrlichia canis* (Santoro et al., 2017), y de otros posibles agentes de interés veterinario, con el fin de purificar y concentrar los ácidos nucleicos para PCR y otras aplicaciones posteriores.

Por otra parte, los coágulos pueden recolectarse mediante cardiocentesis, extraerse de las fosas nasales o heridas abiertas (Fleer et al., 2014). Los estudios han revelado que los coágulos de sangre de animales muertos podrían usarse para recuperar ADN protozoario como *Babesia* en bovinos hasta 26 horas después de la muerte (Singh et al., 2007); ADN de *Theileria* y *Babesia* en sangre coagulada de caballos vivos (Jaffer et al., 2010), y agentes virales de sangre coagulada de perros (Calderón et al., 2007). Otro método de conservación citado para los coágulos de sangre y la sangre no coagulada son las tarjetas FTA, cuyo objetivo es proteger el ADN de las muestras e inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (Smith y Burgoyne, 2004).

## Conclusiones

Los atropellos de fauna silvestre pueden ser incorporados en diversos tipos de investigaciones científicas, ya sea la información geográfica recabada de dónde ocurren los atropellos y que permitan la implementación de medidas de seguridad para la fauna silvestre, como la construcción de pasos subterráneos o arbóreos en lugares donde así sea necesario. Por otro lado, aunque la información que se puede obtener de carcasas de animales atropellados es muy dependiente del grado de descomposición, el aprovechamiento al máximo del uso de tejidos y su estabilización, brinda datos importantes sobre la ecología de parásitos y microorganismos patógenos, también servirán de centinelas y como base para estudios de vigilancia pasiva. Dentro de un



enfoque *Una Salud*, el aprovechamiento de las carcasas bajo estos criterios, debe ser abordada de forma interdisciplinaria, lo cual incluiría el “reclutamiento” de personal que monitoree estos accidentes en áreas cercanas a parques nacionales o áreas naturales, además de personal capacitado que realice la colecta de ectoparásitos, la necropsia de las carcasas y el procesamiento serológico o molecular para la detección de potenciales patógenos (Richini-Pereira et al., 2010; Schwarz et al., 2020; Aguilar-Vargas et al., 2021).

## Referencias bibliográficas

- Aguilar-Vargas F, Solorzano-Scott T, Baldi M, Barquero-Calvo E, Jiménez-Rocha A, Jiménez C, et al. 2022. Passive epidemiological surveillance in wildlife in Costa Rica identifies pathogens of zoonotic and conservation importance. *PLoS ONE* 17: e0262063. DOI: 10.1371/journal.pone.0262063.
- Anónimo. 2000. *Collecting and Preserving Insects and Arachnids A Manual for Entomology and Arachnology*. ARC —Plant Protection Research Institute Private Bag X134, Pretoria, 0001 South Africa. ISBN 1-868-49144-7.
- Arzúa M, Brescovit A. 2006. Métodos de coleta e preservação para identificação. En: Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara G. (Edits). *Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical*. Vox/ICTTD-3/Bu-tantan. ISBN: 85-99909-01-0. Pp. 183-204.
- Bermúdez S, Esser H, Miranda R, Moreno R. 2015. Wild carnivores as hosts for ticks (Ixodida) in Panama. *Syst. Appl. Acarol.* 20: 13-19. DOI: 10.11158/saa.20.1.2.
- Bermúdez S, Martínez-Mandiche J, Domínguez L, Gonzalez C, Chavarria O, Moreno A, Góndola J, Correa N, Rodríguez I, Castillo B, Smith D, Martínez AA. 2021. Diversity of Rickettsia in ticks collected from wild animals in Panama. *Ticks Tickborne Dis.* 12: 101723. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2021.101723.
- Borda-de-Água L, Grilo C, Pereira H. 2014. Modeling the impact of road mortality on barn owl (*Tyto alba*) populations using age-structured models. *Ecol. Mod.* 276: 29-37. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2013.12.022
- Brooks, J. W. 2016. Postmortem changes in animal carcasses and estimation of the postmortem interval. *Vet. Pat.* 53: 929-940. DOI: 10.1177/0300985816629720.
- Calderón M, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125: 341-349. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.020.
- Campana M, Hawkins M, Henson L, Stewardson K, Young H, Card L, Lock J, Agwanda B, Brinkerhoff J, Gaff H, Helgen K. 2016. Simultaneous identification of host, ectoparasite and pathogen DNA via in-solution capture. *Mol. Ecol. Res.* 16: 1224-1239. DOI: 10.1111/1755-0998.12524.
- Castro A, Guerrero O. 2001. *Fundamentos de Parasitología*. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. MP-0201.
- Ceia-Hasse A, Borda-de-Água L, Grilo C, Pereira H. 2017. Global exposure of carnivores to roads. *Global Ecol. Bio-Geo* 26: 592-600. DOI: 10.1111/geb.12564.
- da Costa IN, Oliveira MA, de Paulo PFM, Carioca ALPM, Garcia MV, Aguirre AAR, de Medeiros JF. 2022. *Amblyomma* ticks in animal carcasses hunted in Matinguari National Park, Western Amazon, Brazil: New records on species and host-parasite relationships. *Ticks Tickborne Dis.* 13: 101973. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2022.101973.
- Delahay, R.J., Smith, G. C., Barlow, A. M., Walker, N., Harris, A., Clifton-Hadley, R. S., & Cheeseman, C. L. 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Vet. J.* 173: 287-301. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.11.011.
- Delgado-V C. 2012. Mamíferos hospederos de Ambliopinina (Coleoptera: Staphylinidae) en el norte de los Andes de Colombia. *Brenesia* 78: 90-92.
- dos Santos A, Navas-Suárez P, Guerra J, Ervedosa T, Rivas L, Joppert A, Machado E, Ressio R, Jesus I, Carvalho J, Matsumoto P. 2022. Toxoplasmosis in a free-ranging hairy dwarf porcupine (*Sphiggurus spinosus*) with a potential novel genotype. *Trans. Emerg. Dis.* 69: e3225-e3230. DOI: 10.1111/tbed.14487.

- Ebani, V. V., Verin, R., Fratini, F., Poli, A., Cerri, D. 2011. Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from central Italy. *J. Wildl. Dis.* 47: 699-703. DOI: 10.7589/0090-3558-47.3.699.
- Fleer K, Foley P, Calder L, Foley J. 2014. Arthropod vectors and vector-borne bacterial pathogens in Yosemite National Park. *J. Med. Entomol.* 48: 101-110. DOI: 10.1603/me10040.
- Flynn R. 1973. Nematodes. In *Parasites of Laboratory Animals*. Ames, Iowa: Iowa State University Press. Pp. 203-320.
- Gottdenker N, Wallace R, Gómez H. 2001. La importancia de los atropellos para la ecología y conservación: *Dinomys branickii* un ejemplo de Bolivia. *Ecol. Bolivia* 35: 61-67.
- Guimaraes J, Tucci A, Barros-Battesti D. 2001. Ectoparasitos de importancia veterinaria. *FAPESP Brasil*. Pp 215.
- Hirunkanokpun S, Ahantarig A, Baimai V, Pramual P, Rakthong P, Trinachartvanit W. 2022. Spotted fever group *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Coxiella*-like endosymbiont in *Haemaphysalis* ticks from mammals in Thailand. *Vet. Res. Commun.* DOI: 10.1007/s11259-022-09980-x.
- Jaffer O, Abdishakur F, Hakimuddin F, Riya A, Wernery U, Schuster R. 2010. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol. Res.* 106: 709-713. DOI: 10.1007/s00436-009-1669-5.
- Levine N. 1961. *Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man*. Minneapolis, Minn.: Burgess. Pp. 412.
- Lykidis, D., Van Noorden, S., Armstrong, A., Spencer-Dene, B., Li, J., Zhuang, Z., & Stamp, G. W. (2007). Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucl. Acids Res.* 35: e85. DOI: 10.1093/nar/gkm433.
- Mazur-Panasiuk N, Woźniakowski G. 2020. Natural inactivation of African swine fever virus in tissues: Influence of temperature and environmental conditions on virus survival. *Vet. Microbiol.* 242: 108609. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108609.
- Medrano-Vizcaíno P, Grilo C, Silva Pinto F, Carvalho W, Melinski R, Schultz E, González-Suárez M. 2022. Roadkill patterns in Latin American birds and mammals. *Global Ecol. Biogeo.* 1–28. DOI: <https://doi.org/10.1111/geb.13557>.
- Mehlhorn H. 2016. *Animal Parasites: Diagnosis, Treatment, Prevention*. Springer International Publishing. ISBN 3319464027, 9783319464022. Pp. 719.
- Morelle K, Lehaire F, Lejeune P. 2013. Spatio-temporal patterns of wildlife-vehicle collisions in a region with a high-density road network. *Nat. Conserv.* 5: 53–73. DOI: 10.3897/natureconservation.5.4634
- Muñoz-García C, Guzmán-Cornejo C, Rendón-Franco E, Villanueva-García C, Sánchez-Montes S, Acosta-Gutierrez R, Romero-Callejas E, Díaz-López H, Martínez-Carrasco C, Berriatua E. 2019. Epidemiological study of ticks collected from the northern tamandua (*Tamandua mexicana*) and a literature review of ticks of Myrmecophagidae anteaters. *Ticks Tickborne Dis.* 10:1146-1156. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.06.005.
- Oteo JA, Nava S, Sousa Rd, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, Labruna MB, Zavala-Castro J; RIICER. 2014. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev. Chilena Infectol.* 31: 54-65. DOI: 10.4067/S0716-10182014000100009.
- Reid R, Koch PL. 2017. Isotopic ecology of coyotes from scat and road-kill carcasses: A complementary approach to feeding experiments. *PLoS ONE* 12: e0174897. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174897>
- Reisfeld L, Sacristán C, Machado E, Sánchez-Sarmiento A, Costa-Silva S, Ewbank A, Navas-Suárez, P, Guerra J, Barrel J, Réssio R, Favero C. 2019. *Toxoplasmosis* and *Sarcocystis* spp. infection in wild pinnipeds of the Brazilian coast. *Dis. Aq. Org.* 136: 235-241. DOI: 10.3354/dao03410.
- Richini-Pereira V, Bosco S, Theodoro R, Barrozo L, Bagagli E. 2010. Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. *J. Ven. An. Tox. Tropical Dis.* 16: 607-613. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000400011>.
- Robertson L, Clark C, Debenham J, Dubey J, Kváč M, Li J, Ponce-Gordo F, Ryan U, Schares G, Su C, Tsaousis A. 2019. Are molecular tools clarifying or confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife? *Int. J. Parasitol.* 9: 323-341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.01.010>.

- Rodríguez-Castro K, Ciochetti G, Ribeiro J, Ribeiro M, Galetti P. 2017. Using DNA barcode to relate landscape attributes to small vertebrate roadkill. *Biodiver. Conservation* 26: 1161-1178. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-017-1291-2>.
- Ruiz I, Soriguer R, Perez J. 1993. Pharyngeal Bot Flies (Oestridae) from Sympatric Wild Cervids in Southern Spain. *J. Parasitol.* 79: 623. DOI:10.2307/3283394.
- Sánchez, G. 1990. Manual de técnicas de recolección conservación y envío de muestras veterinarias a los laboratorios. Programa Nacional de Sanidad Animal. Pp 206.
- Santolin I, Famadas K, McIntosh D. 2013. Detection and identification of *Rickettsia* agents in ticks collected from wild birds in Brazil by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. *Rev. Bras. Med. Vet.* 35: 68-73. DOI: <https://bjvm.org.br/BJVM/article/view/670>.
- Santoro, M., D'Alessio, N., Cerrone, A., Lucibelli, M. G., Borriello, G., Aloise, G., ... & Galiero, G. 2017. The Eurasian otter (*Lutra lutra*) as a potential host for rickettsial pathogens in southern Italy. *PLoS One* 12, e0173556. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173556>
- Schwartz A, Shilling F, Perkins S. 2020. The value of monitoring wildlife roadkill. *Eur. J. Wildlife Res.* 66: 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1357-4>.
- Singh H, Mishra A, Rao J, Tewari A. 2007. A PCR assay for detection of *Babesia bigemina* infection using clotted blood in bovines. *J. Appl. Anim. Res.* 32: 201. DOI: 10.1007/s12639-014-0417-7.
- Smith L, Burgoyne L. 2004. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC Ecol.* 4: 1-11. DOI: 10.1186/1472-6785-4-4.
- Sorensen A, Rahman E, Canela C, Gangitano D, Hughes-Stamm S. 2016. Preservation and rapid purification of DNA from decomposing human tissue samples. *For. Sci. Int. Gen.* 25: 182-190. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.05.013.
- Spolidorio M, Andreoli G, Martins T, Brandão P, Labruna M. 2012. Rickettsial infection in ticks collected from road-killed wild animals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Entomol.* 49:1510-1514. DOI: 10.1603/me12089. DOI: 10.1603/me12089.
- Szekeres S, Docters van Leeuwen A, Tóth E, Majoros G, Sprong H, Földvári G. 2019. Road-killed mammals provide insight into tick-borne bacterial pathogen communities within urban habitats. *Transbound. Emerg. Dis.* 66: 277-286. DOI: 10.1111/tbed.13019.
- Waage J, Montgomery G. 1976. *Cryptoses choloepi*: a coprophagous moth that lives on a sloth. *Science* 193: 157-158. DOI:10.1126/science.193.4248.157.
- White C, Dusek, R. 2015. Wildlife specimen collection, preservation, and shipment. In: Franson J, Friend M, Gibbs S, Wild M. Eds. *Field manual of wildlife diseases: U.S. Geological Survey Techniques and Methods 15-C4*, Pp. 24. DOI: 10.3133/tm15c4.
- Williams AF, Wells JK. 2005. Characteristics of vehicle-animal crashes in which vehicle occupants are killed. *Traffic Inj. Prev.* 6: 56-59. DOI: 10.1080/15389580590903186.
- Woodford M. (ed.). 2000. Post-mortem procedures for wildlife veterinarians and field Biologists. Published jointly by the Office International des Epizooties, Care for the Wild and the Veterinary Specialist Group/Species Survival Commission of the World Conservation Union (IUCN). 66 pp.