



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

**IDENTIFICACIÓN DE *Plasmodium* spp. Y *Haemoproteus* spp.  
MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES Y MICROSCÓPICAS EN AVES  
DEL ORDEN PASSERIFORMES EN DOS ZONAS DE LAS  
ESTRIBACIONES ANDINAS DEL ECUADOR**

**AUTOR: TORRES REDROVÁN, JOCELYN ALEJANDRA**

**DIRECTORA: CHÁVEZ LARREA, MARÍA AUGUSTA M.Sc.s**

**SANGOLQUÍ**

**2019**



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**IDENTIFICACIÓN DE *PLASMODIUM* SPP. Y *HAEMOPROTEUS* SPP. MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES Y MICROSCÓPICAS EN AVES DEL ORDEN PASSERIFORMES EN DOS ZONAS DE LAS ESTRIBACIONES ANDINAS DEL ECUADOR**” fue realizado por la señorita **Torres Redrován, Jocelyn Alejandra** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de junio del 2019

Firma:

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'MARIA AUGUSTA'.

**MVZ. María Augusta Chávez Larrea M.Sc**

C.C. 0201274842



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Torres Redrován, Jocelyn Alejandra* declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Identificación de *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. mediante técnicas moleculares y microscópicas en aves del orden Passeriformes en dos zonas de las estribaciones andinas del Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 28 de junio del 2019

Firma:

Una firma manuscrita en azul que parece decir 'Jocelyn A. Torres Redrován', escrita sobre una línea de puntos.

**Jocelyn Alejandra Torres Redrován**

C.C. 1725537698



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## AUTORIZACIÓN

Yo, *Torres Redrován, Jocelyn Alejandra* autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Identificación de *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. mediante técnicas moleculares y microscópicas en aves del orden Passeriformes en dos zonas de las estribaciones andinas del Ecuador**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de junio del 2019

Firma:

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Jocelyn A. Torres Redrován', escrita sobre una línea horizontal punteada.

**Jocelyn Alejandra Torres Redrován**

C.C. 1725537698

## DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado con mucho cariño a los pilares de mi vida, Silvia y Gladys, que han puesto en mi todo su amor, dedicación y constancia para darme la mejor formación personal y académica.

Madre, sin ti esta meta no podría haber sido alcanzada, gracias por tu confianza en mí y por tus palabras de aliento en aquellos momentos cuando parecía que no podía más. Abuelita Gladys, tu cariño y tus mimos son sinónimo de paz en mi vida. Padre, de ti aprendí que la responsabilidad y la disciplina son dos valores que dicen mucho de una persona. Y hermana, cada momento a tu lado es sinónimo de alegría y diversión.

A mis docentes de la Universidad de las Fuerzas Armadas porque con su ejemplo me han enseñado como desenvolverme a futuro como una buena profesional.

A mis amigas y amigos de la Universidad, con los que compartí momentos inolvidables. Especialmente a Danilo y su familia, por brindarme su amistad, cariño y apoyo durante mis años de estudio.

*Alejandra*

## AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Biotecnología Animal, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, a sus tesisistas y pasantes. Especialmente a la Dra. María Augusta Chávez, al Dr. Armando Reyna y a la Ing. Cristina Cholota por su apoyo científico, dedicación y sugerencias en cada ensayo realizado.

Al Laboratorio de Bacteriología, al Laboratorio de Parasitología, a la Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador, por el apoyo con las instalaciones y los equipos necesarios. Asimismo a sus respectivos técnicos, docentes y tesisistas por la compañía en cada avance de este proyecto.

A la Unidad de Estudios de la Vida Silvestre de la Universidad Central del Ecuador por el financiamiento para el desarrollo de este trabajo. A la Dra. Nivia Luzuriaga y al Dr. Richard Rodríguez por su dedicación y colaboración científica, a la Dra. Nataly Reyes por su apoyo logístico, y a la Dra. Karla Mena por compartir sus conocimientos en la observación e identificación microscópica de hemoparásitos.

Al Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito, Dra. Elissa Bonaccorso por la provisión de los controles positivos para el desarrollo de este trabajo.

**ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>CN</b>	Control negativo
<b>CP</b>	Control positivo
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>dNTPs</b>	Mix de desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>eV</b>	Electronvoltio
<b>FTA</b>	Flinders technology associates
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>MalAvi</b>	Base de datos unificada de parásitos de la malaria aviar
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Militros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetros

<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>PBS</b>	Fosfato buffer salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>seg</b>	Segundos
<b>spp.</b>	Especies
<b>Tris – HCL</b>	Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreuro
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### Tabla de contenido

CERTIFICACIÓN.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ABREVIATURAS .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
RESUMEN .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo General.....	5
1.3.2. Objetivos Específicos .....	5

1.4. Hipótesis .....	6
<b>CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
2.1. El orden haemosporida .....	7
2.1.1. Características generales.....	7
2.1.2. Vectores de transmisión.....	7
2.1.3. Ciclo de vida de haemosporidios en aves.....	8
2.1.3.1. Familia Plasmodiidae .....	11
2.1.3.2. Familia Haemoproteidae .....	13
2.1.4. Patogenicidad y virulencia en aves.....	15
2.2. Factores ecológicos implicados en el parasitismo .....	17
2.2.1. Parasitismo en hábitats perturbados .....	19
2.2.2. Parasitismo en hábitats no perturbados .....	19
2.3. Métodos de detección de haemosporidios .....	20
2.3.1. Técnica de microscopía .....	20
2.3.1.1. Características de la familia Plasmodiidae .....	21
2.3.1.1. Características de la familia Haemoproteidae .....	26
2.3.2. Técnica de PCR anidada.....	28
2.4. Distribución geográfica .....	29
2.4.1. Malaria aviar en el Neotrópico .....	29

2.5. Aves del orden Passeriformes.....	30
2.5.1. Clasificación de aves passerines.....	30
2.5.2. Características generales.....	31
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1. Fase de campo .....	32
3.1.1. Área de estudio .....	32
3.1.2. Captura de aves.....	33
3.1.3. Recolección de muestras de sangre .....	33
3.1.3.1. Preparación de frotis sanguíneos .....	33
3.1.3.2. Almacenamiento en tarjetas FTA.....	34
3.2. Fase de laboratorio.....	34
3.2.1. Tinción de los frotis sanguíneos .....	34
3.2.2. Análisis microscópico e identificación morfológica .....	35
3.2.3. Determinación de densidad parasitaria.....	36
3.2.4. Determinación de la intensidad de infección.....	36
3.2.5. Extracción de ADN de sangre almacenada en tarjetas FTA .....	37
3.2.6. Cuantificación de ADN .....	39
3.2.7. Evaluación de la integridad de ADN .....	39

3.2.8. Identificación de muestras positivas a <i>Haemoproteus</i> spp. y <i>Plasmodium</i> spp. mediante PCR convencional .....	40
3.2.9. Identificación de muestras positivas a <i>Haemoproteus</i> spp. y <i>Plasmodium</i> spp. mediante PCR anidada .....	42
3.2.10. Visualización de productos de PCR .....	43
3.2.11. Secuenciación .....	44
3.2.12. Ensamblaje de secuencias .....	44
3.2.13. Análisis de similitud y homología .....	44
3.2.14. Análisis filogenético .....	45
3.2.15. Análisis estadístico .....	46
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
4.1. Prevalencia de haemosporidios .....	47
4.2. Microscopía e intensidad de infección .....	55
4.3. Análisis molecular .....	59
4.3.1. Ensayo de sensibilidad diagnóstica de PCR convencional y PCR anidada....	59
4.3.2. Análisis molecular mediante PCR anidada .....	62
4.4. Caracterización de <i>Plasmodium</i> spp. y <i>Haemoproteus</i> spp.....	63
4.4.1. Análisis de similitud de las secuencias obtenidas por la PCR anidada .....	63
4.4.2. Análisis filogenético de secuencias del citocromo B .....	70

4.4.2.1. Relaciones filogenéticas entre linajes de <i>Haemoproteus</i> .....	71
4.4.2.2. Relaciones filogenéticas entre linajes de <i>Plasmodium</i> .....	73
CAPITULO V: CONCLUSIONES .....	78
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES .....	79
CAPITULO VII: REFERENCIA BIBIOGRÁFICA.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Diferencias generales entre los estados adultos de hemoparásitos (macrogametocitos y microgametocitos).</i> .....	21
<b>Tabla 2.</b> <i>Método de cruces para estimar la densidad parasitaria en un frotis sanguíneo.</i> .....	36
<b>Tabla 3.</b> <i>Cebadores para amplificar la región del citocromo B de los parásitos Haemoproteus spp. y Plasmodium spp.</i> .....	41
<b>Tabla 4.</b> <i>Composición del coctel de la PCR convencional para la detección de hemoparásitos del género Haemoproteus spp. y Plasmodium spp.</i> .....	41
<b>Tabla 5.</b> <i>Programa de PCR anidada para amplificar la región del citocromo B de los parásitos Haemoproteus spp. y Plasmodium spp.</i> .....	41
<b>Tabla 6.</b> <i>Composición del coctel de la primera ronda de PCR para la detección de hemoparásitos del género Haemoproteus spp. y Plasmodium spp. mediante la técnica de PCR anidada.</i> .....	42
<b>Tabla 7.</b> <i>Composición del coctel de la segunda ronda de PCR para la detección de hemoparásitos del género Haemoproteus spp. y Plasmodium spp. mediante la técnica de PCR anidada.</i> .....	43
<b>Tabla 8.</b> <i>Secuencias de Plasmodium spp. y Haemoproteus spp. empleadas para el análisis filogenético, detallando su procedencia, número de acceso de GenBank y linaje asignado según MalAvi.</i> .....	45
<b>Tabla 9.</b> <i>Comparación del número de aves diagnosticadas con los hemoparásitos Plasmodium spp. y Haemoproteus spp. mediante la técnica de PCR anidada y microscopía, en los Bosques de Oglán Alto y Valle Hermoso.</i> .....	49

<b>Tabla 10.</b> <i>Densidad parasitaria e intensidad de infección de hemoparásitos del género Plasmodium spp. y Haemoproteus spp. en aves passeriformes en relación al sitio de estudio y especie, mediante la técnica de microscopía.</i> .....	59
<b>Tabla 11.</b> <i>Resumen del resultado del análisis de similitud realizado en las bases de datos del GenBank y MalAvi para las 30 muestras obtenidas por la amplificación del citocromo B.</i> .....	66
<b>Tabla 12.</b> <i>Nombres asignados a los linajes únicos de Plasmodium spp. y Haemoproteus spp. hallados en los Bosques del Oglán Alto y Valle Hermoso.</i> .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general del ciclo de infección de haemosporidios. ....	9
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de los hemoparásitos. ....	10
<b>Figura 3.</b> Esquema del ciclo vital de <i>Plasmodium relictum</i> . ....	12
<b>Figura 4.</b> Ciclo vital de <i>Haemoproteus mansonii</i> . ....	14
<b>Figura 5.</b> Esquema de trofozoitos juveniles de diferentes especies de <i>Plasmodium</i> . ....	22
<b>Figura 6.</b> Trofozoitos juveniles del género <i>Plasmodium</i> (a-d).....	22
<b>Figura 7.</b> Esquema de merontes eritrocíticos de <i>Plasmodium relictum</i> .....	23
<b>Figura 8.</b> Esquema de merontes eritrocíticos de <i>Plasmodium vaughani</i> . ....	24
<b>Figura 9.</b> Merontes eritrocíticos en diferentes estados de desarrollo. ....	24
<b>Figura 10.</b> Esquema de microgametocitos de dos especies diferentes de <i>Plasmodium</i> . ....	25
<b>Figura 11.</b> Comparación de macrogametocitos de <i>P. relictum</i> y <i>P. vaughani</i> .....	25
<b>Figura 12.</b> Gametocitos maduros del género <i>Plasmodium</i> . ....	26
<b>Figura 13.</b> Esquema de gametocitos de <i>Haemoproteus mansonii</i> .....	27
<b>Figura 14.</b> Macrogametocito y microgametocito maduro de <i>Haemoproteus majoris</i> . ....	27
<b>Figura 15.</b> Gametocitos juveniles (a, b), macrogametocito adulto (j), microgametocito adulto (q) del género <i>Haemoproteus</i> .....	28
<b>Figura 16.</b> Técnica de zig - zag para la búsqueda e identificación de hemoparásitos en los campos ópticos de un frotis sanguíneo. ....	35
<b>Figura 17.</b> Descripción de la cantidad de aves capturadas en función de su orden taxonómico, en los Bosques Protector Oglán Alto y Valle Hermoso.....	47



<b>Figura 18.</b> Detección de los parásitos <i>Plasmodium</i> spp. y <i>Haemoproteus</i> spp. mediante la técnica de PCR anidada, en los Bosques Protector Oglán Alto y Valle Hermoso.....	49
<b>Figura 19.</b> Detección de los parásitos <i>Plasmodium</i> spp. y <i>Haemoproteus</i> spp. mediante la técnica de microscopía, en los Bosques Protector Oglán Alto y Valle Hermoso. ....	50
<b>Figura 20.</b> Observación de hemoparásitos adultos del género <i>Haemoproteus</i> en la muestra P134, confirmada molecularmente. ....	56
<b>Figura 21.</b> Observación de hemoparásitos adultos y juveniles del género <i>Haemoproteus</i> en la muestra P99, confirmada molecularmente.....	56
<b>Figura 22.</b> Observación de sospechosos a gametocitos juveniles del género <i>Plasmodium</i> en la muestra P57, confirmado molecularmente.....	57
<b>Figura 23.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del gradiente de concentración de la muestra P86 para la estimación de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de PCR convencional. ....	60
<b>Figura 24.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del gradiente de concentración de la muestra P86 para la estimación de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de PCR anidada. ....	61
<b>Figura 25.</b> Corrida electroforética (1.5% agarosa) de las muestras analizadas mediante la técnica de PCR anidada. ....	63
<b>Figura 26.</b> Árbol filogenético de máxima verosimilitud de <i>Haemoproteus</i> spp. basados en las secuencias de una región del citocromo B. ....	73
<b>Figura 27.</b> Árbol filogenético de máxima verosimilitud de <i>Plasmodium</i> spp. basados en las secuencias de una región del citocromo B. ....	75

## RESUMEN

La malaria aviar es una enfermedad causada por los parásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus*, que comprometen la condición física y reproductiva de las aves, amenazando la conservación de especies endémicas. Actualmente, ya ha sido reportada en algunas áreas protegidas de las provincias de Esmeraldas, Pichincha, Morona Santiago, Napo, Orellana, Loja. Sin embargo, poco se sabe sobre su prevalencia en hábitats fragmentados, para ello en este estudio se compararon dos zonas, con y sin intervención humana, analizando 33 passerines del Bosque Valle Hermoso y 107 passerines del Bosque Protector Oglán Alto, mediante microscopía y PCR anidada. Los fragmentos de 478 pb del citocromo B fueron secuenciados, analizados en las bases de datos del GenBank - MalAvi mediante BLAST y analizados filogenéticamente mediante el método de máxima verosimilitud. En Valle Hermoso y Oglán Alto, se detectaron prevalencias de malaria aviar de 18.18% (6/33) y 3.81% (4/105) mediante microscopía, mientras que empleando PCR anidada aumentaron a 48.39% (15/31) y 17.14% (18/105), respectivamente. Las infecciones producidas por *Plasmodium* spp. no estuvieron asociadas a cada zona con diferente grado de intervención humana ( $p > 0.05$ ), mientras que las infecciones por *Haemoproteus* spp. sí ( $p < 0.05$ ). Finalmente, se hallaron 17 linajes de hemoparásitos, 8 de los cuales fueron identificados como linajes únicos, incluyendo 5 linajes de *Haemoproteus* en Valle Hermoso, un linaje de *Haemoproteus* y 2 de *Plasmodium* en Oglán Alto. Así, se concluyó que el hábitat fragmentado de Valle Hermoso promovió la prevalencia de malaria aviar en passerines silvestres, favoreciendo a la diversidad de *Haemoproteus* spp.

### **PALABRAS CLAVE:**

- ***PLASMIDIUM***
- ***HAEMOPROTEUS***
- **MICROSCOPIA**
- **PCR ANIDADA**

## ABSTRACT

Avian malaria is a disease caused by *Plasmodium* and *Haemoproteus* parasites, which compromise the physical and reproductive condition of birds, jeopardizing the endemic species conservation. Currently, it has already been reported in some protected areas in the provinces of Esmeraldas, Pichincha, Morona Santiago, Napo, Orellana, Loja. However, little is known about its prevalence in fragmented habitats, in this study, two zones were compared with and without human intervention, analyzing 33 passerines from Valle Hermoso Forest and 107 passerines from Oglán Alto Protected Forest, through microscopy and nested PCR. The 478 bp fragments of cytochrome B were sequenced, analyzed in the databases of GenBank - MalAvi by BLAST and phylogenetically analyzed through maximum likelihood method. In Valle Hermoso and Oglán Alto, avian malaria prevalences of 18.18% (6/33) and 3.81% (4/105) were detected by microscopy, while using nested PCR increased to 48.39% (15/31) and 17.14% (18/105), respectively. *Plasmodium* spp. infections were not associated with each area with a different degree of human intervention ( $p>0.05$ ), while *Haemoproteus* spp. infections were ( $p<0.05$ ). Finally, 17 hemoparasite lineages were found, 8 of which were identified as unique lineages, including 5 *Haemoproteus* lineages in Valle Hermoso, one *Haemoproteus* and 2 *Plasmodium* lineages in Oglán Alto. Thus, it was concluded that the fragmented habitat of Valle Hermoso promoted the prevalence of avian malaria in wild passerines, favoring the diversity of *Haemoproteus* spp.

### KEYWORDS:

- ***PLASMIDIUM***
- ***HAEMOPROTEUS***
- **MICROSCOPY**
- **NESTED PCR**

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

Los estudios de hemoparásitos en aves comenzaron a finales del siglo XIX en Rusia, a través de la técnica de microscopía, centrándose principalmente en la familia Plasmodiidae, debido a la necesidad de establecer los ciclos de vida, modo de infección y el desarrollo de vacunas contra el agente causante de la malaria humana. Con el paso del tiempo, en la última década del siglo XX, el enfoque de su estudio cambió debido a que los planes de conservación y de reintroducción de aves en cautiverio condujeron a la muerte masiva de individuos en estado silvestre, despertando el interés por conocer la ecología, biología, distribución, patogenicidad y filogenia de los parásitos del orden Haemosporida (Valkiūnas, 2005).

La taxonomía tradicional basada en la observación de caracteres morfológicos, reconoció 16 especies de *Plasmodium* y 63 especies de *Haemoproteus* en aves Passeriformes (Valkiūnas, 2005). Sin embargo, a partir del año 1983 con la aparición de las técnicas moleculares y la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramientas de detección, la diversidad de linajes identificados aumentó significativamente (Alarcon *et al.*, 2010; Valkiūnas & Iezhova, 2018; Waldenström *et al.*, 2004). De esta manera, por primera vez, la PCR convencional se empleó en la detección de malaria aviar, Feldman *et al.* (1995) detectó *Plasmodium* en aves de Hawaii empleando como marcador molecular una región del gen 18S del ARN ribosomal del parásito (Waters & Mccutchan, 1989), mientras que Bensch *et al.* (2000) detectó *Plasmodium* y *Haemoproteus* en aves Passeriformes empleando un fragmento del gen del citocromo B del ADN mitocondrial. Poco después, Richard *et al.* (2002) comparó la efectividad de ambos marcadores moleculares, verificando experimentalmente que al amplificar el gen del

cyt B, existe mayor tasa de detección de malaria aviar en muestras confirmadas por microscopía. En tanto que, Waldenström *et al.* (2004) demostró que la PCR anidada que amplifica un fragmento del gen del cyt B es una herramienta mucho más específica y sensible para evaluar la prevalencia de *Haemoproteus* y *Plasmodium* en aves.

Desde el año 2004, se desarrollaron nuevos protocolos de PCR anidada con nuevos cebadores que amplificaban marcadores nucleares como DHFR-TS, SSU-rRNA, DGAT, LSU-rRNA, TRAP, ClpC, y marcadores mitocondriales como Cyt oxidase 3, y nuevas regiones del Cyt-b para poder detectar mayor número de especies y comprender mejor las implicaciones evolutivas y ecológicas que conducen a una diversidad genética de los parásitos (Clark *et al.*, 2014).

Hoy en día, las técnicas utilizadas para el diagnóstico de hemoparásitos son la biología molecular y microscopía, ambas complementarias (Valkiūnas *et al.*, 2006). Ya que en la observación de frotis sanguíneos con el microscopio óptico se pueden distinguir las etapas de vida del parásito y estimar la intensidad de la infección, mientras que al emplear los protocolos de PCR de Waldenström *et al.* (2004) o el ligeramente modificado de Hellgren *et al.* (2004), se pueden detectar infecciones con baja parasitemia e incluso se pueden distinguir sin problemas linajes muy filogenéticamente cercanos.

Por otra parte, las enfermedades aviares introducidas son una preocupación para la conservación de especies endémicas, y Ecuador al ser un país con una gran diversidad de ecosistemas, especies y genes también se incluye en el problema (Bravo, 2013). Especialmente, al tener conocimiento de que la diversidad de aves en América del Sur abarca 28 órdenes, 96 familias y 440 especies, de las cuales cerca del 90% se sitúa en los Andes de Colombia, Ecuador,

Perú, Bolivia debido a sus pronunciados gradientes altitudinales y climáticos que favorecen a la especiación y la divergencia evolutiva (Harrigan *et al.*, 2014).

Esta tendencia también se refleja en la diversificación de Haemosporidia aviar, puesto que estudios realizados en reservas, bosques protegidos, parques nacionales y estaciones científicas de diferentes provincias del país (Pichincha, Esmeraldas, Morona Santiago, Azuay, Loja, Zamora Chinchipe, Napo, Santa Elena, Galápagos y Francisco de Orellana), en los años comprendidos entre 1999 y 2017, han demostrado que existen abundantes linajes de *Plasmodium* y *Haemoproteus*, y principalmente que la prevalencia de haemosporidios ha aumentado conforme el tiempo (Cadena Ortiz, 2015; Harrigan *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 2013; Mantilla *et al.*, 2016; Mena, 2018; Moens & Pérez-Tris, 2015; Moens *et al.*, 2016; Munro *et al.*, 2009; Svensson *et al.*, 2013).

Además, se ha observado que los factores ecológicos que favorecen la presencia de hemoparásitos en América del Sur son la altura, la temperatura y la precipitación (Jones *et al.*, 2013). Aunque según Renner *et al.* (2016) y Sehgal (2015), el factor primordial es la presencia y abundancia del vector en un hábitat, el cual afecta directamente la dinámica de infección huésped-parásito; de manera que, las características y recursos del hábitat son de cierta manera concluyentes en la tasa e intensidad de infestación parasitaria.

## **1.2. Justificación**

En condiciones naturales, los parásitos dentro de un hábitat son capaces de mantener el equilibrio y la dinámica poblacional, ya que pueden causar el debilitamiento de una población hasta conseguir la evolución o extinción de la misma (Gulland, 1995; Harvell *et al.*, 2002; Woodworth *et al.*, 2005); por ello, los haemosporidios han sido detectados en las aves de todas

las regiones del mundo, excepto la Antártida (Valkiūnas, 2005). Sin embargo, el problema comienza cuando debido al incremento de los efectos antropogénicos como el cambio climático, la deforestación, la fragmentación de un hábitat y la urbanización, la dinámica de transmisión parásito - huésped se ve alterada (Dobson & Foufopoulos, 2001; Sehgal, 2015; Warner, 1968), y emergen enfermedades infecciosas en nuevos hospederos (Alarcon *et al.*, 2010; Schrag & Wiener, 1995).

El Ecuador es considerado uno de los países megadiversos del mundo, debido a que posee un gran número de especies por metro cuadrado (Sierra *et al.*, 2002), donde alberga al 17% de las especies de aves a nivel mundial (Freile *et al.*, 2017). Como consecuencia, los parásitos generalistas, capaces de infectar a varias especies hospedadoras se ven favorecidos y de este modo, la transmisión de hemoparásitos se vuelve exitosa. De hecho, estudios en la comunidad de Wisui, provincia de Morona Santiago, demostraron que Ecuador alberga un mayor número de especies de *Haemoproteus* generalistas en comparación a cualquier otra región del Neotrópico (Moens & Pérez-Tris, 2015).

Por otro lado, el paso de aves migratorias en el país, como patos y cisnes (Smith & Ramey, 2015) o aves paseriformes de hábitos migratorios (Perlut *et al.*, 2018), que migran en invierno desde Norteamérica a los países de Sudamérica, son un riesgo de transmisión de nuevos hemoparásitos.

Los efectos en la salud de las aves pueden variar entre leves y letales, dependiendo la especie (Renner *et al.*, 2016), la edad (Fecchio *et al.*, 2014) y el tipo de contacto del parásito con el hospedero, es decir, si el parásito fue introducido deliberadamente o naturalmente (Daszak *et al.*, 2000). Generalmente, el síntoma más común es la anemia, aunque cuando existen infecciones

mixtas de *Plasmodium* y *Haemoproteus* en la fauna silvestre, los efectos son graves y pueden provocar hasta la extinción de una especie (Valkiūnas, 2005).

En este contexto y a fin de incrementar la información existente sobre hemoparásitos en Ecuador, este estudio empleará en paralelo, la técnica de microscopía y la PCR anidada de Waldenström *et al.* (2004) para poder distinguir infecciones mixtas (Bernotienė *et al.*, 2016; Valkiūnas *et al.*, 2006; Zehtindjiev *et al.*, 2012), estimar la densidad e intensidad parasitaria, e identificar los linajes de *Plasmodium* y *Haemoproteus* (Alger, 2001). Así se establecerá el estatus actual de las poblaciones de Passeriformes de dos diferentes tipos de hábitats, en Oglán Alto y Valle Hermoso, localizados en la región Andina.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Identificar *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. mediante técnicas moleculares y microscópicas en aves del orden Passeriformes en dos zonas de las estribaciones andinas del Ecuador.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Identificar la presencia de *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. en aves del orden Passeriformes de las zonas de Oglán Alto y Valle Hermoso con microscopía óptica y PCR convencional.
- Caracterizar los linajes de hemoparásitos identificados en aves del orden Passeriformes mediante secuenciación.



- Establecer si existe diferencia entre la biodiversidad de Haemosporidios del género *Plasmodium* y *Haemoproteus* encontrada en las dos zonas de estudio mediante un análisis de métodos no paramétricos

#### **1.4. Hipótesis**

La identificación de hemoparásitos en aves del orden Passeriformes mediante la técnica molecular y de microscopía, respectivamente, permitirán diferenciar las dos zonas de estudio.

## CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. El orden haemosporida

#### 2.1.1. Características generales

Los parásitos del orden haemosporida son un grupo de protistas endoparásitos especializados que se desarrollan en dos tipos de hospederos, un intermediario y un definitivo. Es decir, su crecimiento y reproducción asexual tiene lugar en la sangre de anfibios, reptiles, aves y mamíferos, mientras que su reproducción sexual se da en el intestino de insectos que actúan como vectores de transmisión (Atkinson & Van Riper III, 1991; Levin & Parker, 2012; Valkiūnas, 2005).

Aunque dentro de este orden existen cuatro familias (plasmodiidae, haemoproteidae, leucocytozoidae y garniidae), las familias plasmodiidae y haemoproteidae han sido las más estudiadas ya que sus miembros son los agentes causales de la malaria aviar (Richard *et al.*, 2002). De manera que su sistema parásito – huésped está bien establecido (Garcia *et al.*, 2019) y se considera históricamente a los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*, muy patogénico y relativamente benigno, respectivamente (Levin & Parker, 2012).

#### 2.1.2. Vectores de transmisión

La palabra vector hace referencia al organismo capaz de transmitir un parásito entre hospederos. Así para poder transmitir la malaria aviar, los insectos deben ser hematófagos y pertenecer al orden díptera. En la transmisión, intervienen diferentes familias en función del género de haemosporidios, por ejemplo los hemoparásitos del género *Plasmodium* intervienen sólo los mosquitos hembra de la familia culicidae, donde la mayor parte de las especies

pertenecen a los géneros *Culex*, *Aedes*, *Culiseta* y *Anopheles*. Mientras que los del género *Haemoproteus* son transmitidos por mosquitos de la familia Ceratopogonidae y las moscas piojo de la familia Hippoboscidae (Valkiūnas, 2005).

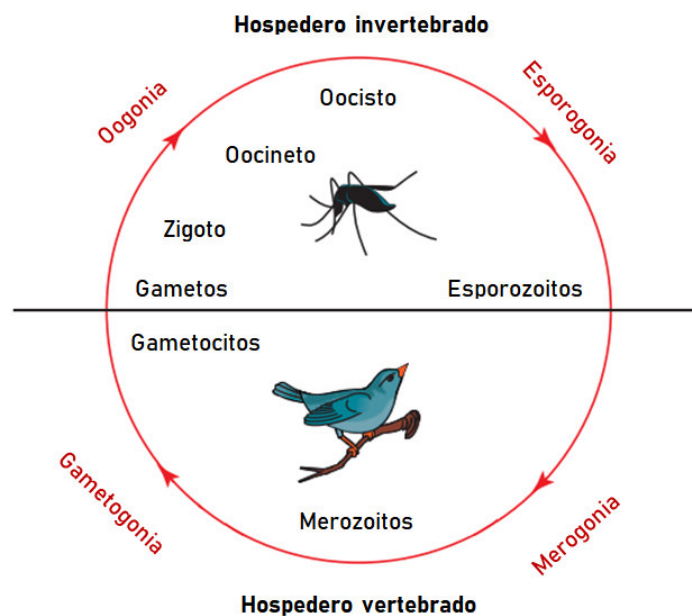
Por otro lado, los hemoparásitos han desarrollado estrategias adaptativas en sus vectores. Así, los insectos transmisores de *Plasmodium* spp. sufren disminuciones drásticas en su fecundidad y a cambio adquieren aumentos significativos en su longevidad, para poder transmitir por más tiempo a los parásitos (Vézilier *et al.*, 2012), y la razón según Martínez de la Puente (2010) radica en que el parásito busca producir una respuesta inmune duradera que disminuya su eficacia biológica. Adicionalmente, otra estrategia descrita es el incremento de la atracción de vectores hacia un ave infectada (Cornet *et al.*, 2013b, 2013a).

### **2.1.3. Ciclo de vida de haemosporidios en aves**

Los hemoparásitos poseen un ciclo vital bastante complejo (Levin & Parker, 2012), ya que su desarrollo implica varias etapas en las que se producen cambios de hospedero, diferentes formas de reproducción y cambios morfofuncionales (Valkiūnas, 2005).

En la Figura 1, se observa que la dinámica de transmisión requiere de un vector infectado y de un ave, en donde las etapas parasitarias comienzan con el desarrollo de los esporozoitos hasta la formación del oocisto, a través de divisiones celulares asexuales (esporogonia, merogonia, gametogonia, gametogénesis, esporogonia) y sexuales (oogonia). Mientras que en la Figura 2, se puede visualizar la forma de cada estado parasitario, comenzando con el ciclo exo-eritrocítico para formar merozoitos, el ciclo eritrocítico para formar gametocitos, la división sexual y la esporogonia en los insectos para producir esporozoitos que iniciarán nuevos ciclos de infección (Rivero & Gandon, 2018; Valkiunas & Iezhova, 2017). Los esporozoitos y gametocitos

representan el estado del parásito que es infeccioso para el ave y el vector, respectivamente (Levin & Parker, 2012; Valkiūnas, 2005).

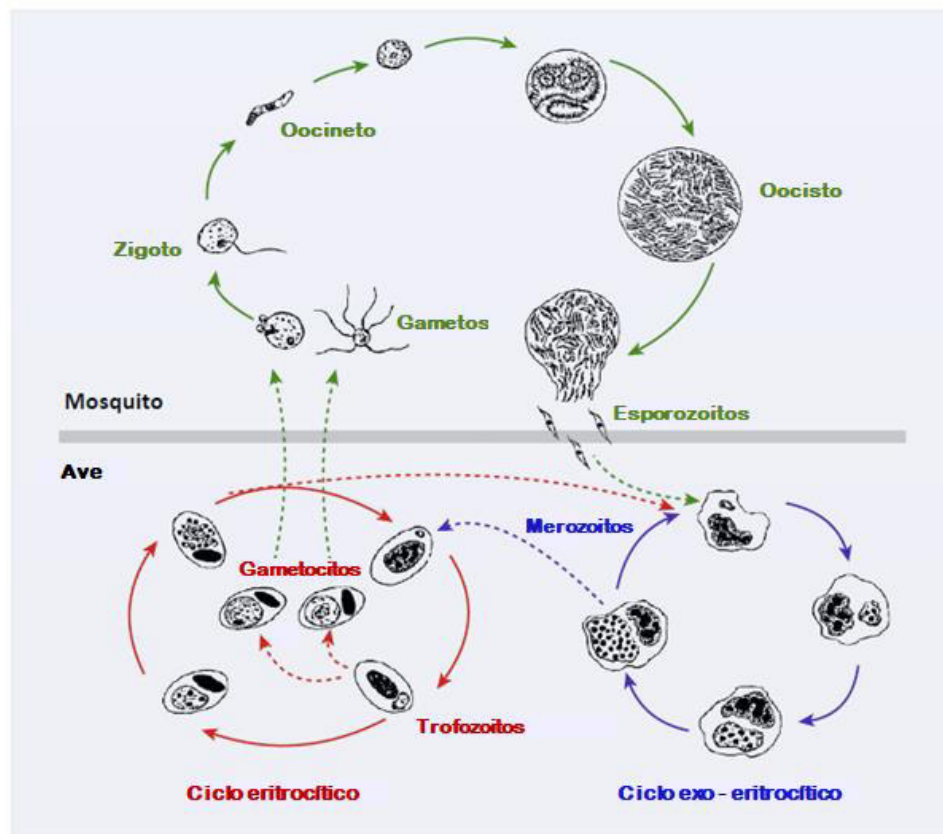


**Figura 1.** Esquema general del ciclo de infección de haemosporidios.

Fuente: (Levin & Parker, 2012).

El ciclo comienza cuando un insecto infectado se alimenta de la sangre de un ave y transfiere varios esporozoitos mediante la secreción de sus glándulas salivales, los cuales infectan los tejidos del ave e inician el ciclo exo-eritrocítico, en el que mediante una o varias merogonias formarán abundantes merozoitos unicelulares y se habrá conseguido la adaptación en el interior del ave. Después, inicia el ciclo eritrocítico, donde los merozoitos migran a los eritrocitos y mediante gametogonia se transforman en microgametocitos (macho) y macrogametocitos (hembra). Entonces, cuando un nuevo insecto se alimenta del ave infectada, se contagia con ambos gametocitos, los cuales maduran en gametos por gametogénesis y luego, se reproducen sexualmente mediante oogonia para formar el cigoto (Levin & Parker, 2012; Valkiūnas, 2005).

Finalmente, el cigoto se transforma en un oocineto móvil alargado, que penetra la capa epitelial del intestino medio y reposa bajo la lámina basal durante algunos días hasta convertirse en un oocisto, el cual se caracteriza por estar encapsulado por una pared. Mientras esto ocurre, en el interior del oocisto, se da la formación de numerosos esporozoitos (cuerpos alargados uninucleares) mediante varias esporogonias. Así cuando la maduración del oocisto termine, se romperá y se liberarán esporozoitos, que infectarán las glándulas salivales del vector para que empiece nuevamente el ciclo de infección (Levin & Parker, 2012; Rivero & Gandon, 2018; Valkiūnas, 2005).



**Figura 2.** Ciclo de vida de los hemoparásitos.

Fuente: (Rivero & Gandon, 2018)

Durante cada etapa parasitaria los haemosporidianos son haploides. Solo el cigoto tiene un conjunto diploide ( $2n$ ) de cromosomas, cuya carga se reduce mediante meiosis cuando se dan las etapas de desarrollo del oocineto (Valkiūnas, 2005).

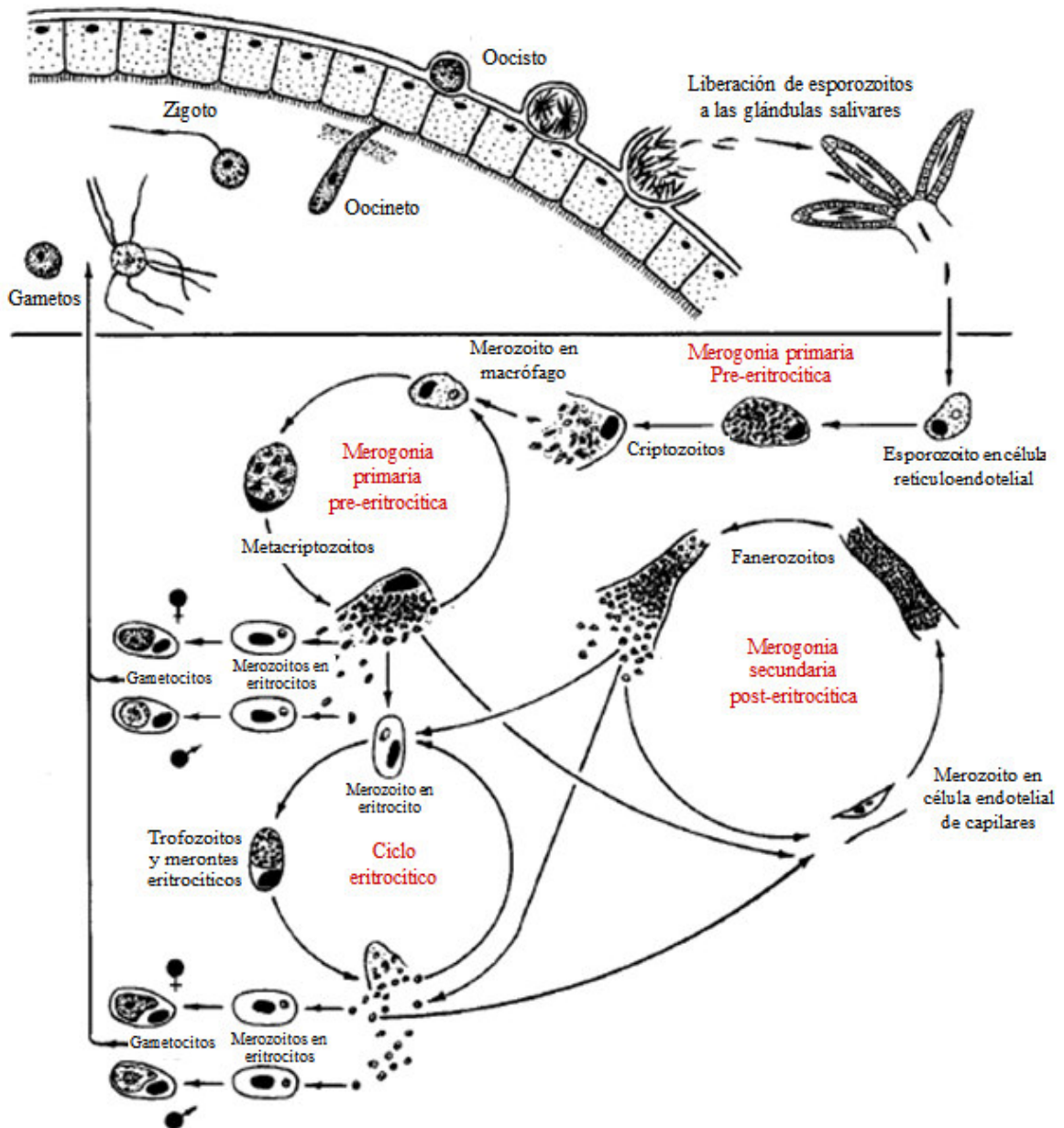
Por otro lado, cabe mencionar que la gametogénesis tiene lugar debido a estímulos como el cambio en la concentración de oxígeno y dióxido de carbono, cuando la sangre se transfiere del ave al insecto. En donde, un macrogametocito forma un solo macrogameto de forma redonda, mientras que el microgametocito da lugar a ocho microgametos con forma de hilos móviles (Valkiūnas, 2005).

Del ciclo de vida detallado previamente, el desarrollo del parásito en el hospedero invertebrado es igual en todos los miembros del orden Haemosporida, con la peculiaridad de que los tiempos son diferentes en función de la familia de los mosquitos. Sin embargo, en el desarrollo parasitario de las familias plasmodiidae y haemoproteidae, existen diferencias significativas en el lugar y la manera en la que se lleva a cabo los ciclos exo-eritrocítico y eritrocítico en el interior del ave (Valkiūnas, 2005).

#### **2.1.3.1. Familia Plasmodiidae**

El ciclo de vida de los parásitos de esta familia involucra la existencia de merontes en los ciclos exo-eritrocítico y eritrocítico, tal como se observa en la Figura 3. De modo que, la merogonia primaria (pre-eritrocítica), ocurre en las células endoteliales de los capilares y de los sistemas hemopoyético y linfoide, para formar dos generaciones de merontes, los criptozoitos y metacriptozoitos. Los criptozoitos se localizan en el bazo, miden hasta  $30\ \mu\text{m}$  de diámetro y dan lugar hasta 100 merozoitos, que son capaces de inducir a la segunda generación de merontes en los macrófagos para formar metacriptozoitos, donde una parte de los metacriptozoitos pasan al

ciclo eritrocítico para formar gametocitos, otra induce a la siguiente generación de metacriptozoitos y otra induce a la merogonia secundaria (post-eritrocítica), que consiste en varias generaciones de merontes llamadas fanerozoitos (Valkiūnas, 2005).



**Figura 3.** Esquema del ciclo vital de *Plasmodium relictum*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)

En el ciclo eritrocítico, los merozoitos penetran en los eritrocitos jóvenes y se vuelven de forma redondeada, dando lugar a los merontes eritrocíticos llamados trofozoitos, los cuales se dividen asexualmente y forman merozoitos uninucleares. Al liberarse tendrán tres destinos: formar gametocitos en eritrocitos maduros, inducir más ciclos de merontes eritrocíticos y penetrar en las células endoteliales de los capilares de muchos órganos, incluido el cerebro, para inducir a la merogonia secundaria post-eritrocítica (Valkiūnas, 2005).

Una vez que los gametocitos maduros llegan al intestino de los mosquitos se lleva a cabo el proceso descrito previamente en el ciclo general de haemosporidios, con la peculiaridad de que el oocisto de *P. relictum* mide al menos 40  $\mu\text{m}$ , posee gránulos de pigmento, y desarrolla cientos de esporozoitos en función de la temperatura, siendo la más óptima 24-25°C. Si el desarrollo ocurre a temperaturas más altas, la viabilidad de los esporozoitos disminuye, mientras que ocurre degeneración del oocisto si la temperatura es muy baja, alrededor de 4°C (Valkiūnas, 2005).

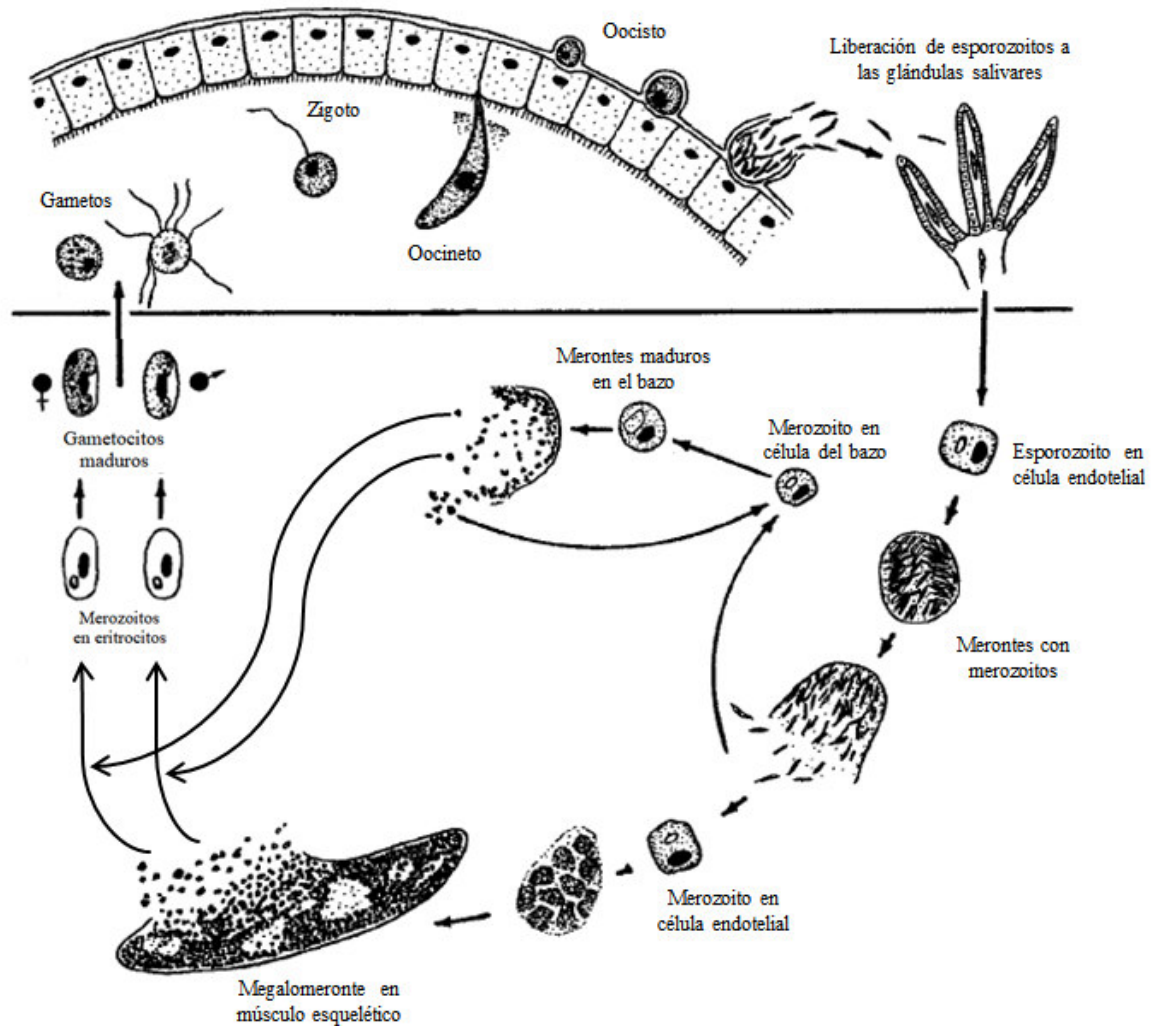
### **2.1.3.2. Familia Haemoproteidae**

El ciclo exo-eritrocítico de los miembros de esta familia puede comenzar en las células endoteliales, los macrófagos fijados o los miofibroblastos del ave, donde se produce la primera generación de merontes que alcanzan un tamaño de 20  $\mu\text{m}$  y contienen merozoitos alargados de 5 a 6  $\mu\text{m}$ . Tal como se muestra en la Figura 4, la presencia de cada merozoito es capaz de inducir a una segunda merogonia, dando lugar a merontes de hasta 100  $\mu\text{m}$  en las células del bazo, pulmón, hígado, riñones, corazón, músculo esquelético y otros órganos del ave (Valkiūnas, 2005).

En algunas especies, en las células endoteliales de los capilares y los miofibroblastos del músculo esquelético y del músculo cardíaco es posible la formación de megalomerontes



(merontes de segunda generación), cuyo tamaño puede exceder las 400  $\mu\text{m}$  y posee numerosos merozoitos redondos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, capaces de entrar al ciclo eritrocítico. Entre 1 y 15 merozoitos pueden penetrar a un solo eritrocito, y después de 2 a 6 días forman gametocitos maduros, capaces de entrar a gametogénesis (Valkiūnas, 2005).



**Figura 4.** Ciclo vital de *Haemoproteus mansonii*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)

Después de que un mosquito se infecta con la sangre del ave, los gametocitos maduros empiezan a redondearse y se liberan de los eritrocitos para formar microgametos de 10 a 18  $\mu\text{m}$

y macrogametos con un diámetro de 6 a 7  $\mu\text{m}$ , los cuales se reproducirán sexualmente (Valkiūnas, 2005).

#### 2.1.4. Patogenicidad y virulencia en aves

Cuando un ave es infectada por un hemoparásito atraviesa principalmente las siguientes cuatro etapas, donde el tiempo de cada una diferirá entre cada especie de las familias de haemosporidios (Valkiūnas, 2005):

- **Prepatente**, cuando el desarrollo del parásito se produce en los tejidos del parénquima fuera de la sangre
- **Aguda**, cuando los parásitos aparecen en la sangre del ave y se da un gran aumento de la parasitemia
- **Crisis**, cuando la parasitemia alcanza su punto máximo
- **Crónica o latente**, cuando la parasitemia en sangre disminuye y se mantiene en niveles muy bajos como consecuencia de la respuesta inmune del ave, y a cambio los parásitos permanecen en los órganos internos

Como consecuencia de una infección, las aves pueden reducir su condición física, su reproducción y su esperanza de vida (Lachish *et al.*, 2011; Marzal *et al.*, 2008; Merino *et al.*, 2000), ya que existe aceleramiento del envejecimiento celular (Asghar *et al.*, 2015). Especialmente, si es producida por *Plasmodium* ya que se induce a anemia, agrandamiento y necrosis del bazo e hígado, y a hemorragias cerebrales y edemas (Rivero & Gandon, 2018).

Los hemoparásitos tienen la capacidad de persistir en las aves, por lo que un ave infectada mantendrá a los parásitos durante muchos años o incluso por el resto de su vida, siendo así el origen de infección de nuevos vectores. Así pues, existirán recaídas sólo en momentos de estrés

fisiológico y durante la reproducción del ave, para transmitir la infección a la descendencia y mantener el parásito en la naturaleza (Allander, 1997; Valkiūnas, 2005).

En la mayoría de los casos, el estudio de la patogenicidad y su efecto en la salud de aves se han basado solo en experimentos de laboratorio con aves domésticas o en cautiverio, dilucidando efectos en la inversión parental de las aves y en el retraso en la eclosión de huevos (Levin & Parker, 2012; Marzal, 2005; Rivero & Gandon, 2018). No obstante, monitoreos en aves silvestres durante aproximadamente una década, encontraron efectos subletales en la supervivencia, el comportamiento, la selección de pareja y el éxito reproductivo (Fallon *et al.*, 2003).

De modo que, el impacto en aves puede ser significativo, tanto en situaciones en las que el parásito ha sido recientemente introducido como en las situaciones en las que las aves han evolucionado con linajes locales durante un largo período de tiempo (Levin & Parker, 2012), produciendo efectos letales y subletales, respectivamente (Rivero & Gandon, 2018).

Normalmente si la patogenicidad de un hemoparásito oscila entre alto y moderado, el sistema inmune del ave puede manejar la situación, no obstante puede volverse peligrosa o letal cuando existe coinfección con un segundo linaje de haemosporidio, ya que su sistema inmune al encontrarse previamente comprometido es más susceptible (Levin & Parker, 2012).

Por último, varios estudios resumidos por Rivero & Gandon (2018), conducen a que la razón por la que los hemoparásitos son altamente virulentos radica en su plasticidad, es decir, la capacidad de adaptación y respuesta a cambios en el estado fisiológico del hospedador o a condiciones ambientales desfavorables. Por ejemplo, en respuesta a la administración de medicamento antimalárico, los parásitos aumentan la proporción de microgametocitos para

garantizar la fertilización de un mayor número de macrogametocitos (Paul *et al.*, 2000; West *et al.*, 2002). Mientras que cuando un ave infectada tiene una recaída de *Plasmodium* y hay presencia de mosquitos en el ambiente, el hemoparásito mejora su replicación dentro del huésped para aumentar su tasa de transmisión (Cornet *et al.*, 2014).

## **2.2. Factores ecológicos implicados en el parasitismo**

El parasitismo se define como una asociación entre dos organismos, en la que el parásito depende del hospedero para su supervivencia y reproducción, comprometiendo así la eficacia biológica del hospedero durante toda o alguna parte de su vida (Marzal, 2005).

Desde otra perspectiva, es un fenómeno ecológico, que se considera esencial para la vida ya que los parásitos ejercen presiones selectivas, creando eventos evolutivos que permiten la diversificación de las especies (Araújo *et al.*, 2003). Así, los hemoparásitos tienen un rol fundamental en la estructuración de las comunidades de hospederos, pudiendo afectar la abundancia de diferentes especies y determinar la biodiversidad de las comunidades (Poulin, 1999), como regular la evolución de sus hospederos (Navas *et al.*, 2007).

En la actualidad, es posible que en una región geográfica coexistan linajes de parásitos especialistas y generalistas, capaces de infectar a una sola especie de ave y a un gran rango de especies, respectivamente (Marzal, 2005). Aunque los hemoparásitos generalistas son predominantes en algunas regiones de América del Norte, Europa (Hellgren *et al.*, 2009) y Sudamérica (Moens *et al.*, 2016).

Algunos autores han determinado que para el caso de la malaria aviar, un linaje generalista ofrece más oportunidades de transmisión que un especialista, conduciendo a una mayor prevalencia en la comunidad de acogida. Ya que un linaje especialista es más eficiente en

la explotación de su hospedero, mientras que un linaje generalista al utilizar múltiples hospederos permite que los parásitos tengan una mayor distribución geográfica (Rivero & Gandon, 2018). No obstante, según Garcia-Longoria *et al.* (2019), la prevalencia de un hemoparásito es fortuita, ya que se debe principalmente a la interacción entre las defensas inmunitarias del huésped (susceptibilidad) y las estrategias de explotación de parásito (virulencia y plasticidad).

Ciertamente, los hemoparásitos se encuentran ampliamente extendidos en la naturaleza. Sin embargo, su prevalencia y el éxito en su dinámica de transmisión depende de la abundancia del vector y del hospedero en un hábitat, lo que directamente está influido por la estructura abiótica que posea un ecosistema (Jones *et al.*, 2013; Renner *et al.*, 2016; Sehgal, 2015). Por ejemplo, la precipitación en bosques tropicales, es una variable que favorece la prevalencia y parasitemia de haemosporidios debido a la mayor abundancia y actividad de los mosquitos (Hernández-Lara *et al.*, 2017).

Por otro lado, si existe una alteración humana de los hábitats y transporte de vectores, en conjunto con el cambio climático antropogénico, no se ve favorecida la evolución, sino la extinción de una especie. Como ejemplo, están las aves endémicas del bosque nativo de Hawaii, que tras la introducción accidental del vector *Culex quinquefasciatus* junto a un nuevo linaje *Plasmodium relictum*, a inicios del siglo XX, continúan teniendo tasas de mortalidad de 65 a 90% como lo demuestra el estudio realizado por Atkinson *et al.* (2000).

Incluso hay evidencia de que si se traslada un ave de su hábitat natural a un nuevo hábitat (como zoológicos) o viceversa, los resultados pueden ser desastrosos. En el primer caso, si su hábitat natural estaba libre de malaria aviar, al ser introducido en una región donde sí está presente, la especie en cuestión se extinguiría. Mientras que en el segundo caso, si se introduce

un ave en cautiverio, la cual probablemente tuvo contacto con un gran rango de parásitos, al ser introducida en un hábitat natural, introducirá un nuevo linaje de parásito que puede ser agresivo con la avifauna nativa (Levin & Parker, 2012; Valkiūnas, 2005).

### **2.2.1. Parasitismo en hábitats perturbados**

Actualmente, el 93% de la superficie del planeta ha sido perturbada por la presencia del ser humano, dando lugar a cambios a nivel estructural y funcional, causando la pérdida del hábitat y de su biodiversidad (Markesteijn, 2015).

Uno de los principales efectos es la alteración de las interacciones biológicas, incluyendo la dinámica entre parásitos y hospederos (Renner *et al.*, 2016; Sehgal, 2015). Ya que se ha visto un aumento en la presencia y abundancia del vector, producida por los cambios en las condiciones ambientales, la sobrepoblación de hospederos y la llegada de nuevos hospederos, parásitos y vectores (Fischer & Lindenmayer, 2007). Además de una mayor parasitemia en aves en bosques fragmentados (Ogrzewalska *et al.*, 2011).

Por otro lado, la degradación de la cobertura de un bosque primario da lugar a un bosque secundario, donde el impacto producido es reversible, ya que solo disminuye la calidad en cuanto a su vegetación, fauna y suelo mas no su funcionalidad en sí (Markesteijn, 2015).

### **2.2.2. Parasitismo en hábitats no perturbados**

En bosques primarios o vírgenes ocurren alteraciones naturales que se dan a escalas temporales y que provocan impactos agudos que afectan la estructura del hábitat permitiendo conservar el equilibrio entre el hábitat y el ecosistema (Markesteijn, 2015).

Generalmente, un hábitat no perturbado es de gran tamaño y posee nichos ecológicos muy diversos, que albergan una mayor diversidad de hospederos y parásitos en comparación a los hábitats perturbados (Kamiya *et al.*, 2014; Lacorte *et al.*, 2013; Laurance *et al.*, 2013).

### **2.3. Métodos de detección de haemosporidios**

Para el diagnóstico de hemoparásitos se emplea en forma complementaria las técnicas de biología molecular y microscopía. Ya que la observación de frotis sanguíneos en el microscopio óptico permite observar el parásito en el ciclo eritrocítico y cuantificar la intensidad de la infección, mientras que la técnica de PCR permite detectar una baja parasitemia e identificar el género y especie de los parásitos involucrados en la infección (Bensch *et al.*, 2009; Valkiūnas *et al.*, 2006; Valkiūnas, 2005).

Según Valkiūnas *et al.* (2006), las infecciones causadas por más de un linaje de haemosporidio en un hospedero son comunes en aves silvestres, y el emplear únicamente el ensayo de PCR subestima los resultados reales. Por ello para detectar infecciones mixtas, es recomendable emplear una combinación de las técnicas de microscopía y de PCR (Valkiūnas *et al.*, 2006; Zehtindjiev *et al.*, 2012).

#### **2.3.1. Técnica de microscopía**

La técnica de microscopía óptica permitió la detección de haemosporidios en frotis sanguíneos, y durante aproximadamente un siglo dio lugar a su descripción y clasificación basada en la observación de caracteres morfológicos, entre los cuales se considera las mediciones del tamaño y la forma de las células del parásito, la orientación en la célula hospedadora, el número de merozoitos por meronte, el número y la posición de gránulos de hemozoína y vacuolas. (Perkins, 2014).

A pesar de los inconvenientes y la controversia con la precisión de dichos caracteres morfológicos en estados sanguíneos, se han descrito aproximadamente 210 especies de parásitos haemosporidios en aves (Valkiūnas, 2005).

De manera general, una placa bien teñida, según Valkiūnas (2005) permite que el citoplasma de los eritrocitos se observe de color rosado con brillo violeta, mientras que el citoplasma del parásito es de color azul y su núcleo se tiñe de rojo. Por otro lado, la distinción de los gametocitos de los haemosporidios puede ser fácil, ya que presentan dimorfismos sexuales, (Valkiūnas, 2005; Valkiūnas & Iezhova, 2018), como se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Diferencias generales entre los estados adultos de hemoparásitos (macrogametocitos y microgametocitos).*

Macrogametocito	Microgametocito
Citoplasma teñido intensamente de azul	Tinción del citoplasma es más pálida
Núcleo compacto con contorno claro	Núcleo difuso
Presencia de nucléolo	Ausencia de nucléolo
Generalmente hay ausencia de cúmulos de gránulos de hemozoína en los extremos	Acumulación de gránulos de hemozoína en los extremos de los microgametocitos alargados

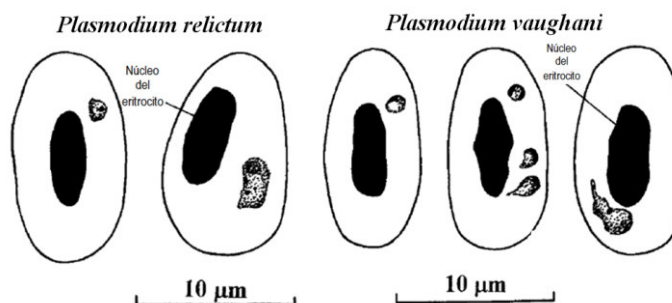
Fuente: (Valkiūnas, 2005; Valkiūnas & Iezhova, 2018)

**2.3.1.1. Características de la familia Plasmodiidae**

Los parásitos de esta familia pueden ser observados en forma de trofozoitos, merontes juveniles, merontes maduros, gametocitos juveniles y gametocitos adultos (Valkiūnas, 2005).



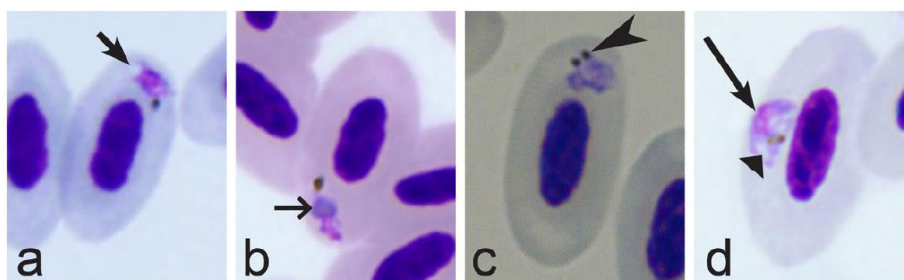
Así los trofozoitos juveniles de diferentes especies pueden observarse, como la Figura 5, donde su tamaño y número de pigmentos de hemozoína varían de acuerdo al crecimiento del parásito, pueden poseer una vacuola grande y un núcleo excéntrico que les da la apariencia de un anillo (Valkiūnas, 2005).



**Figura 5.** Esquema de trofozoitos juveniles de diferentes especies de *Plasmodium*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)

De este modo, en la Figura 6, se pueden observar trofozoitos vistos bajo la luz del microscopio, los cuales son de menor tamaño que el núcleo del eritrocito y poseen pocos gránulos de hemozoína.

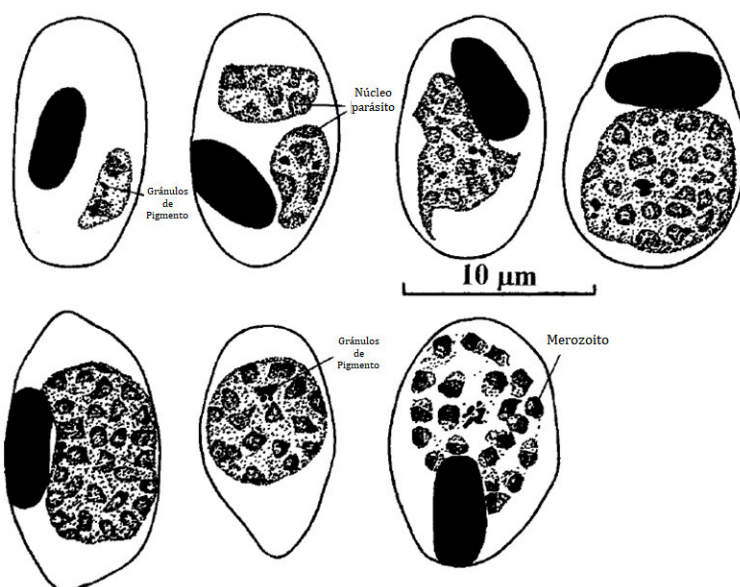


**Figura 6.** Trofozoitos juveniles del género *Plasmodium* (a-d).

Nota: Vacuola (a), glóbulo no refractivo (b), gránulos de hemozoína (c), citoplasma y núcleo del parásito (d).

Fuente: (Valkiūnas & Iezhova, 2018)

Los merontes eritrocíticos pueden ser visibles desde su primera división nuclear hasta conseguir la formación de merozoitos como se observa en la Figura 7 y Figura 8. Una característica en común es que contienen gránulos de color dorado, marrón o negro, que provienen de la digestión incompleta de la hemoglobina en el interior de la vacuola, los cuales poseen una fuerte refracción de la luz bajo el microscopio (Valkiūnas, 2005).



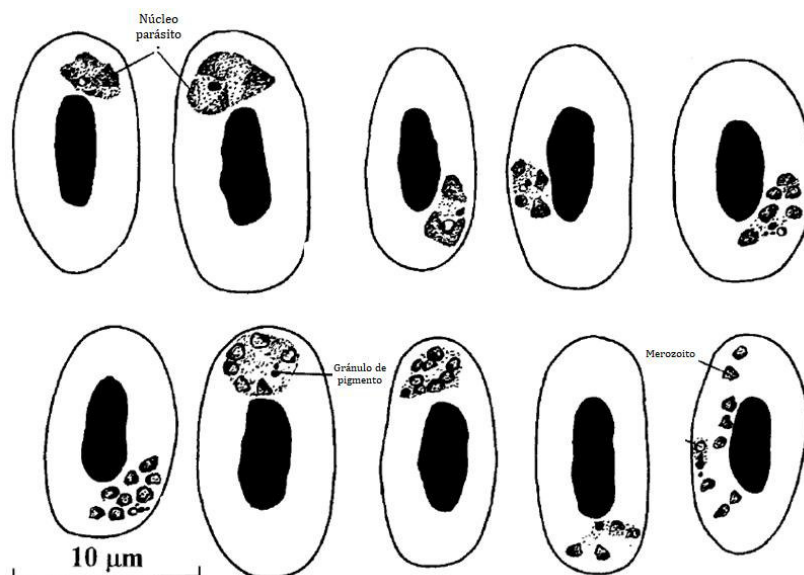
**Figura 7.** Esquema de merontes eritrocíticos de *Plasmodium relictum*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)

Por otro lado, la forma de los merontes eritrocíticos es diferente en cada especie, así en la Figura 7, los merontes de *P. relictum* son redondeados y deforman visiblemente a los eritrocitos infectados, desplazando su núcleo parcialmente hacia un extremo o definitivamente de la célula. Mientras que en la Figura 8, los merontes de *P. vaughari* tienen forma variada y no afectan a la forma ni al núcleo de los eritrocitos infectados (Valkiūnas, 2005).

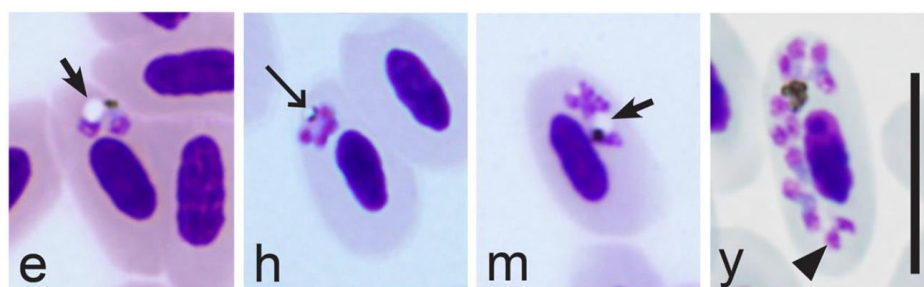
En la Figura 9, se pueden observar el desarrollo de merontes eritrocíticos vistos bajo la luz del microscopio, comenzando con un meronte juvenil hasta alcanzar la madurez y formar varios

merozoítos. Además son visibles las vacuolas del parásito y gránulos de hemozoína de color negro.



**Figura 8.** Esquema de merontes eritrocíticos de *Plasmodium vaughari*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)



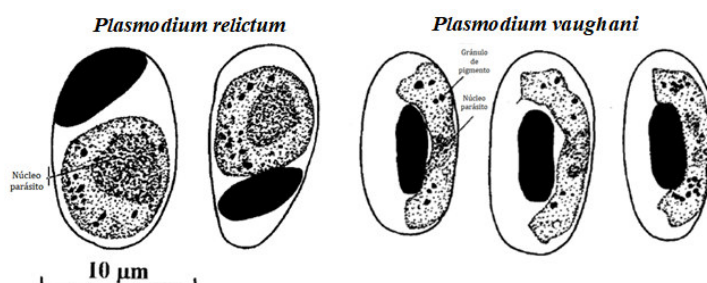
**Figura 9.** Merontes eritrocíticos en diferentes estados de desarrollo.

Nota: juvenil (e), en proceso de desarrollo (h, m), maduro con merozoítos (y).

Fuente: (Valkiūnas & Iezhova, 2018)

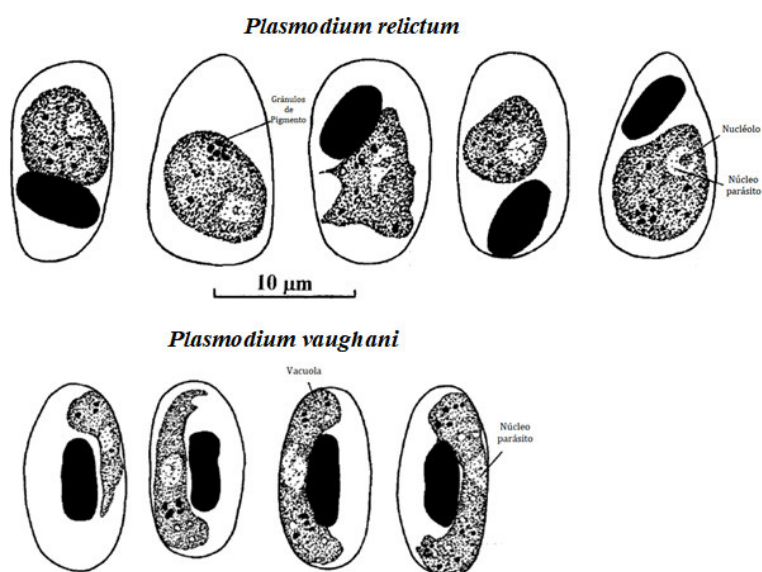
Con respecto a los microgametocitos y macrogametocitos, pueden ser redondeados y deformar al eritrocito como sucede con *P. relictum* o ser alargados sin afectar al eritrocito como sucede con *P. vaughani* (Figura 10, 11). Además, los dimorfismos sexuales y las descripciones

generales de la Tabla 1, son evidentes al observar los esquemas de las Figuras 10, 11, y los parásitos vistos en el microscopio óptico de la Figura 12 (Valkiūnas, 2005).



**Figura 10.** Esquema de microgametocitos de dos especies diferentes de *Plasmodium*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)

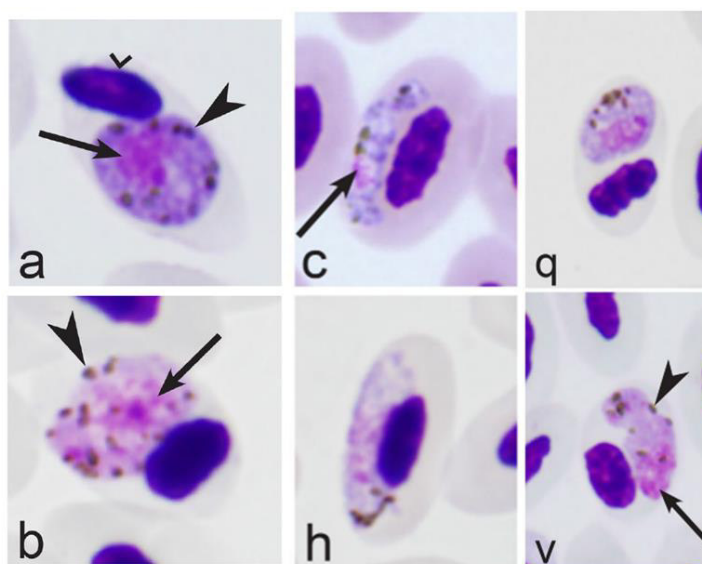


**Figura 11.** Comparación de macrogametocitos de *P. relictum* y *P. vaughani*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)

### 2.3.1.1. Características de la familia Haemoproteidae

Los parásitos de esta familia pueden ser observados en los eritrocitos del ave en forma de gametocitos juveniles, microgametocitos y macrogametocitos (Valkiūnas, 2005).



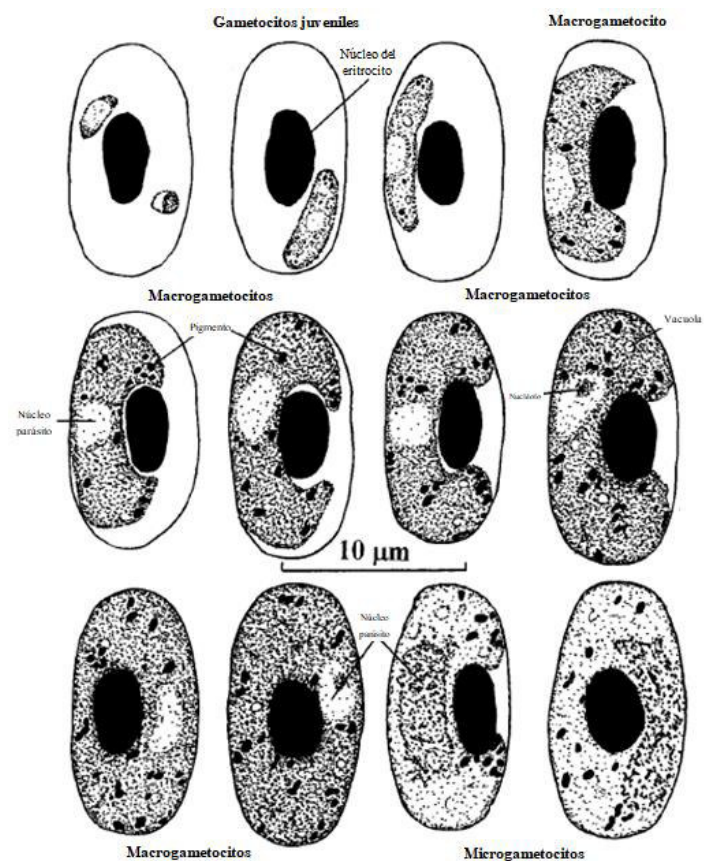
**Figura 12.** Gametocitos maduros del género *Plasmodium*.

Nota: macrogametocitos (a, c, q), microgametocitos (b, h, v).

Fuente: (Valkiūnas & Iezhova, 2018; Valkiūnas *et al.*, 2018)

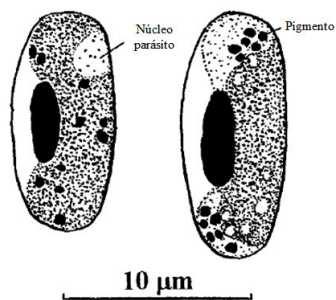
Así, una de las posibles características de los gametocitos maduros y en proceso de desarrollo, es la presencia de gránulos hemozoína o verdadero pigmento de la malaria, como se observa en la Figura 13, 14. Cuya importancia radica en permitir determinar especies de acuerdo a su número, forma y posición (Valkiūnas, 2005).

En la Figura 13, se puede observar que los gametocitos juveniles pueden ser alargados con un tamaño menor a 10  $\mu\text{m}$ , o de forma esférica, que probablemente represente a un merozoito de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro que empieza a madurar (Valkiūnas, 2005).



**Figura 13.** Esquema de gametocitos de *Haemoproteus mansonii*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)

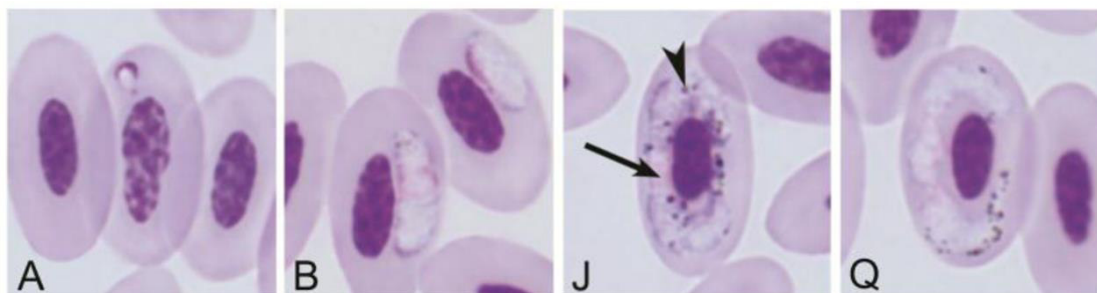


**Figura 14.** Macrogametocito y microgametocito maduro de *Haemoproteus majoris*.

Fuente: (Valkiūnas, 2005)



Por otro lado, las Figuras 13, 14, 15 demuestran los dimorfismos sexuales entre gametocitos (Tabla 1). En la Figura 15, los pigmentos de hemozoína están presentes en los gametocitos adultos y es evidente que el macrogametocito tiene un núcleo bien definido y una tinción más fuerte que el microgametocito.



**Figura 15.** Gametocitos juveniles (a, b), macrogametocito adulto (j), microgametocito adulto (q) del género *Haemoproteus*.

Fuente: (Valkiūnas *et al.*, 2017).

### 2.3.2. Técnica de PCR anidada

La PCR anidada consiste en dos corridas de PCR convencionales consecutivas, en las cuales se emplean dos conjuntos de cebadores diferentes. En donde, el segundo par de cebadores amplifica una región específica dentro del producto de la primera corrida (Rahman *et al.*, 2013).

Una de las ventajas de emplear esta técnica es reducir la contaminación en los productos producido por amplificaciones inespecíficas (Rahman *et al.*, 2013). Además se ha demostrado que para la detección de *Plasmodium vivax* en humanos, su especificidad y sensibilidad es del 81.2% y 97.7%, respectivamente, en comparación con la técnica de microscopía (Genc *et al.*, 2010).

Así en el año 2004, se demostró que el fragmento del gen del citocromo B del ADN mitocondrial de los hemoparásitos puede ser amplificado mediante PCR anidada a partir del ADN extraído de la sangre de un ave infectada para detectar *Plasmodium spp.* y *Haemoproteus spp.* (Waldenström *et al.*, 2004). La detección es posible ya que, estados parasitarios como gametocitos juveniles, gametocitos maduros, trofozoitos, merontes eritrocíticos juveniles y merontes eritrocíticos maduros que contienen mitocondrias (Valkiūnas, 2005), se desarrollan en los glóbulos rojos del ave, por lo que es posible extraer su ADN en conjunto con el ADN del ave.

Según Bensch *et al.* (2009), el protocolo más empleado por los investigadores es el de Waldenström *et al.* (2004), cuyos cebadores externos, HAEMNF y HAEMNR2, amplifican una región de 580 pares de bases, que después de ser amplificada con los cebadores internos HAEMF y HAEMR2 conducen a una región de 524 pares de bases (incluyendo los cebadores).

## **2.4. Distribución geográfica**

La malaria aviar ha sido reportada en todas las regiones geográficas del mundo, a excepción de la Antártica, donde los vectores necesarios para su transmisión están ausentes por las condiciones climáticas (Valkiūnas, 2005).

### **2.4.1. Malaria aviar en el Neotrópico**

El Neotrópico comprendido por la región tropical del continente americano, alberga la mayor diversidad del planeta Tierra (Brown, 2013). Dentro de este marco, la diversidad de haemosporidios es también muy elevada debido sus condiciones climáticas y a la diversidad de sus hospederos (Moens & Pérez-Tris, 2015), ya que se ha determinado que los ambientes más cálidos estimulan las tasas de crecimiento, la capacidad reproductiva y los estados infecciosos de los parásitos (García-Huidobro *et al.*, 2019).



Por otro lado, el ciclo de infección de hemoparásitos es exitoso porque el clima húmedo permite que los vectores estén activos durante todo el año y las aves son residentes permanentes (Valkiūnas, 2005).

## **2.5. Aves del orden Passeriformes**

### **2.5.1. Clasificación de aves passerines**

Las aves son un grupo ecológicamente importante, ya que la radiación adaptativa las ha llevado a diversificarse en 10135 especies (Dickinson & Christidis, 2014), las cuales ocupan diferentes biotopos terrestres alrededor del mundo (excepto de la Antártica) y tienen diversos comportamientos y morfologías (Payevsky, 2014). En contraste, Ecuador es considerado el cuarto país más rico en aves, ya que según el Comité Ecuatoriano de Registros Ornitológicos (CERO), hasta el año 2017, existen 1679 especies de aves (Freile *et al.*, 2017), que representan casi el 17% de las especies a nivel mundial.

En general, el orden passeriforme, está constituido por 6030 especies, que representan casi el 60% de todas las aves, es decir, que representan más de la mitad de las especies de aves descritas en el mundo (Dickinson & Christidis, 2014), por ello según Payevsky (2014), muchos ornitólogos optan por dividir a las aves en passerines y no passerines.

De este modo su clasificación taxonómica incluye 134 familias y 1357 géneros distribuidos en los subórdenes Passeri (oscines), Tyranni (suboscines) y Acanthisitti (Dickinson & Christidis, 2014). Los subórdenes Passeri y Tyranni, se diferencian principalmente en la complejidad de la estructura de la siringe (órgano vocal ubicado en la base de la tráquea que permite el canto). Así, las aves cantoras o del suborden Passeri, representan al 70% de especies del orden Passeriformes y poseen una compleja morfología con la que pueden realizar diferentes

vocalizaciones y cantar un diverso número de canciones (Edwards & Harshman, 2013; Payevsky, 2014).

### **2.5.2. Características generales**

Las aves passeriformes generalmente tienen plumajes de colores muy vistosos, la mayoría de ellas son de pequeño tamaño, cuyo peso varía entre 4 y 6 gramos; no obstante existen individuos de mayor tamaño cuyo peso puede alcanzar 1.5 kilogramos (Payevsky, 2014).

En cuanto a su alimentación, es muy variada pudiendo ser a base de insectos, arañas, anélidos, semillas, frutas y néctar de flores. Es común encontrarlos en bosques tropicales, elaborando diversos tipos de nidos con ramas o hierbas, ya sea en arbustos u orillas de los ríos de corriente rápida (Payevsky, 2014).

Por otro lado, pueden ser migratorios o no migratorios dependiendo de su zona de nidificación. Así, algunos migran desde el Neártico y el Paleártico hacia alrededor del Ecuador, o desde las regiones templadas del sur hasta los trópicos ubicados al norte (Edwards & Harshman, 2013).

En los últimos años han sido muy estudiados porque son un grupo de fácil observación, recolección y estudio para establecer la ecología del comportamiento y la biología de la evolución, así como para el estudio de haemosporidios (Edwards & Harshman, 2013; Payevsky, 2014; Valkiūnas, 2005).

## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Fase de campo

#### 3.1.1. Área de estudio

Para obtener las muestras sanguíneas de aves passeriformes se realizaron muestreos en dos zonas de las estribaciones andinas del Ecuador, con diferente grado de intervención humana.

La recolección fue llevada a cabo por el equipo de investigación de la Unidad de Estudios de la Vida Silvestre de la Universidad Central del Ecuador, bajo la dirección de la Dra. Nivia Luzuriaga. Para ello se contó con la autorización expedida por el Ministerio de Medio Ambiente de Ecuador (Anexo A).

- **Zona sin intervención humana**

**Arajuno – Pastaza:** Se tomaron 111 muestras de sangre aviar del Bosque Protector Oglán Alto, ubicado en la Estación Científica Juri Juri Kawsay perteneciente a la Universidad Central del Ecuador (longitud 1°16'40,74", latitud 1°20'57,87") con una gradiente altitudinal entre 580 m.s.n.m. y 1100 m.s.n.m. (Cajamarca, 2018), durante los meses de diciembre 2017, marzo y junio 2018.

- **Zona con intervención humana**

**Santo Domingo – Santo Domingo de los Tsáchilas:** Se tomaron 33 muestras de sangre aviar del bosque secundario ubicado en la parroquia de Valle Hermoso perteneciente a propiedad privada (longitud 0°00'03,87", latitud 79°17'05,54") con altitudes de 307 m.s.n.m., en el mes de mayo 2018.

### **3.1.2. Captura de aves**

Las aves fueron capturadas con 10 redes de neblina (12m de largo x 2.5m de ancho), ubicadas en diferentes sitios del sotobosque de cada zona de estudio, en horarios de la mañana y la tarde (Mena, 2018; Moens & Pérez-Tris, 2015; Moens *et al.*, 2016).

Después, cada ave fue trasladada en una bolsa ornitológica, para registrar sus medidas morfométricas: masa corporal, sexo, longitud del ala, cola y tarso, e identificarla taxonómicamente según las claves de la Guía de campo de Aves del Ecuador de Ridgely & Greenfielde (2001). Antes de ser liberadas en el sitio de captura, las aves fueron identificadas con anillo numérico único y se extrajo una muestra de sangre de la vena braquial del ala.

### **3.1.3. Recolección de muestras de sangre**

La recolección de las muestras de sangre aviar se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Valkiunas (2005) y adaptado por Mena (2018), que consistió en exponer la vena braquial del ave para punzarla con una aguja hipodérmica y así recolectar de 5 a 80  $\mu$ L de sangre con un microcapilar sin anticoagulante.

#### **3.1.3.1. Preparación de frotis sanguíneos**

De la sangre recolectada en el microcapilar, se colocó una gota en el extremo de un portaobjetos, con otro portaobjetos en un ángulo aproximadamente de 45° se consiguió que la sangre forme una película delgada entre ambos y se realizó un barrido con un movimiento firme y continuo que permitió obtener un extendido fino y uniforme. Se dejó secar por unos minutos, y se procedió a su fijación con metanol al 99% por un lapso de 3 a 5 minutos y su posterior secado a temperatura ambiente (Alarcon & Ramírez, 2015; Valkiūnas, 2005). Todos los frotis

sanguíneos fijados fueron transportados al laboratorio en una caja de almacenamiento para portaobjetos.

### **3.1.3.2. Almacenamiento en tarjetas FTA**

La sangre remanente del microcapilar fue recolectada en el papel filtro de la tarjeta clásica FTA WB120205, la cual tuvo la capacidad de almacenar hasta cuatro muestras por tarjeta, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante y detalladas a continuación.

La muestra fue colocada en el interior de una de las áreas de papel filtro, se etiquetó con lápiz y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, manteniéndola libre de la exposición a la luz directa del sol. Una vez que se recolectó cuatro muestras en una tarjeta, se la envolvió en papel aluminio y se colocó en una bolsa hermética zip-lock de plástico para evitar el contacto con la humedad del ambiente hasta la extracción del ADN.

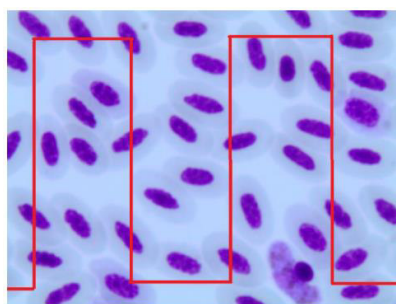
## **3.2. Fase de laboratorio**

### **3.2.1. Tinción de los frotis sanguíneos**

Los frotis sanguíneos fueron teñidos con solución Giemsa en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador. Para ello, todas las placas se sumergieron en cajas coplin llenas de solución Giemsa, durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente y después, el exceso de colorante se lavó suavemente con agua del grifo. Las muestras se secaron y conservaron a temperatura ambiente hasta ser observadas en el microscopio (Mena, 2018; Moens *et al.*, 2016; Valkiūnas, 2005).

### 3.2.2. Análisis microscópico e identificación morfológica

Para la observación de cada frotis fijado y teñido se empleó el microscopio compuesto Motic A210 del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador. Primero se inspeccionó todo el frotis con el lente de 40X para detectar la presencia de parásitos intra y extracelulares (Valkiūnas, 2005). Además, para evitar la confusión entre los campos observados y no observados se empleó la técnica de zig – zag, representado en la Figura 16 (Montoro, 2015).



**Figura 16.** Técnica de zig - zag para la búsqueda e identificación de hemoparásitos en los campos ópticos de un frotis sanguíneo.

Fuente: (Montoro, 2015)

Posteriormente, para la identificación de géneros entre *Haemoproteus* y *Plasmodium*, se examinaron 100 campos empleando el lente de 100X bajo aceite de inmersión y se utilizó como guía, las claves taxonómicas y fotografías de Valkiūnas & Iezhova (2018), Valkiūnas (2005), Valkiūnas *et al.* (2018), Valkiūnas *et al.* (2017). El tiempo empleado por placa fue aproximadamente de 60 minutos.

### 3.2.3. Determinación de densidad parasitaria

Cuando una muestra presentó infección parasitaria, se procedió a estimar su densidad empleando el método de cruces, recomendado por la Organización Mundial de la Salud (Alger, 2001). Para lo cual, se observaron 100 campos ópticos aleatorios con el lente de 100X bajo aceite de inmersión y se estimó si la densidad parasitaria era baja, media, alta, o muy alta considerando los criterios descritos en la Tabla 6 (Alarcon & Ramírez, 2015; Alger, 2001; Mena, 2018).

**Tabla 2**

*Método de cruces para estimar la densidad parasitaria en un frotis sanguíneo.*

Parasitemia observada	Densidad parasitaria por Cruces	Interpretación
1-10 parásitos en 100 campos	+	Baja
11-100 parásitos en 100 campos	++	Media
2-10 parásitos por campo	+++	Alta
>10 parásitos por campo	++++	Muy alta

Fuente: Modificado de (Alger, 2001; Mena, 2018).

### 3.2.4. Determinación de la intensidad de infección

Para determinar la intensidad parasitaria de una placa se utilizó el método descrito por Valkiūnas (2005), Moens & Pérez-Tris (2015), Moens *et al.* (2016), el cual consistió en contar el número de parásitos presentes en 10 000 eritrocitos de extendido fino. Para así, posteriormente obtener el porcentaje de infección al dividir el número de parásitos entre el número de eritrocitos.

### 3.2.5. Extracción de ADN de sangre almacenada en tarjetas FTA

La extracción de ADN de las muestras recolectadas se hizo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, empleando una adaptación del protocolo del Centro de Terapia Génica, Brno, República Checa, modificado por Albán y Tamayo (2009).

De cada muestra, se cortaron 10 trozos de 4 mm<sup>2</sup> de papel filtro con sangre impregnada, empleando para ello hojas de bisturí N°11, y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL, respectivamente. Entre cada muestra, la hoja de bisturí fue desinfectada con alcohol al 70% y fue reemplazada por una nueva cuando se perdió su firmeza al cortar.

Para eliminar la hemoglobina de la sangre, los trozos de papel filtro se lavaron con 1 mL de PBS (10 mM, pH 7.4) enriquecido con 0.05% de Tween 20, dejando reposar una noche a 4°C. Al día siguiente, el tubo fue agitado orbitalmente durante 30 minutos y homogeneizado en un agitador vórtex Velp Scientifica. Luego, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos en la microcentrífuga MIKRO 200 Hettich Lab.

Si al descartar el sobrenadante de cada tubo, se evidenció la eliminación de hemoglobina, se realizó un segundo lavado con PBS enriquecido con Tween 20, caso contrario se procedió a un lavado con 500 µL de PBS (10 mM, pH 7.0).

Después, se adicionó 1 mL de buffer de lisis (CTAB 2%, Tris - HCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, pH 7.5), 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL), y se homogeneizó mediante inversión. El tubo fue incubado en el termobloque con agitación Thermo – Shaker 88810R, a 70°C con agitación de 600 rpm durante 1 hora. Seguidamente, para desactivar la proteinasa K, se homogeneizó en el agitador vórtex y se procedió a una incubación a 95°C con agitación de 200



rpm durante 15 minutos. Luego, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos y se transvasó el sobrenadante en un nuevo microtubo de 2 mL.

La mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en la proporción 24:1 permitió la separación del ADN y de las proteínas y lípidos, así que se agregó 700  $\mu$ L de esta mezcla a cada tubo, se homogeneizó por inmersión y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 minutos. Después, se recuperó solamente la fase acuosa en un nuevo microtubo de 1.5 mL, tomando precaución de no mezclar ambas fases.

Para precipitar el ADN, se adicionó 600  $\mu$ L de etanol absoluto frío, se mezcló suavemente por inmersión y se dejó reposar una noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, para recolectar el ADN, se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante con micropipeta. Luego, se lavó el pellet con etanol al 70% frío, agregando 500  $\mu$ L, mezclando suavemente por inmersión dos veces y centrifugando a 14 000 rpm por 15 minutos.

Se descartó el etanol y para conseguir la evaporación del etanol remanente, se colocó boca abajo al microtubo sobre papel absorbente, durante al menos 20 minutos. Finalmente, para hidratar y diluir el ADN, se agregó 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se dejó reposar a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

Los tubos que contenían trozos de papel filtro fueron lavados con 700  $\mu$ L de PBS (10 mM, pH 7.0). Se omitieron los pasos de la agitación con vórtex y la centrifugación, se retiró el sobrenadante con micropipeta y se dejó secar los trozos de tarjeta FTA a temperatura ambiente durante una noche, para poder conservarlos. De tal manera, que si la concentración de ADN obtenida en alguna muestra fue baja, se volvió a re-extraer ADN, partiendo de un lavado con 500  $\mu$ L PBS (10 mM, pH 7.0) sin centrifugación y continuando con el procedimiento antes descrito.

### **3.2.6. Cuantificación de ADN**

La concentración del ADN extraído fue cuantificada por espectrofotometría UV, mediante el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) del Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador.

Antes de iniciar, se limpió el lente con 2  $\mu$ L de agua destilada y se seleccionó el programa para cuantificación de ácidos nucleicos. Después, se colocó 2  $\mu$ L de solución blanco y se procedió a colocar 2  $\mu$ L de cada muestra para estimar su concentración de ADN y su pureza mediante los índices de 260/280 y 260/230.

### **3.2.7. Evaluación de la integridad de ADN**

La determinación de la integridad de ADN se realizó en los laboratorios de la Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR) de la Universidad Central del Ecuador. Para lo cual, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) según la relación 0,1  $\mu$ L/mL TBE 1X.

Así, en cada pocillo se cargó 3  $\mu$ L de ADN con 1  $\mu$ L de buffer de carga Green GoTaq Flexi 5X, y se configuró la fuente de poder a 120 mA y 100 eV durante 60 minutos. Para visualizar el gel se empleó un transiluminador ENDURO™ UV Transilluminator U1001 y la cámara digital Sony DSC-W800, luego se editó la imagen en el programa FastStone Image Viewer.

Si se observó la presencia de RNA, se procedió a un tratamiento con RNAsa A durante 15 minutos a 37°C.

### **3.2.8. Identificación de muestras positivas a *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp. mediante PCR convencional**

Para la identificación de *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp. se amplificó la región conservada del citocromo B del ADN mitocondrial, utilizando los equipos de los laboratorios de la Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR) de la Universidad Central del Ecuador.

Los controles positivos usados fueron los ADNs de las muestras HFC 034 y HFC 044, positivas para *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp., recolectadas en la tesis de pregrado de Cadena (2015) y proporcionadas por el Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito.

En primera instancia se siguió la metodología de PCR convencional descrita por Bensch *et al.* (2000), utilizando los cebadores HAEMF y HAEMR2, descritos en la Tabla 3 y sintetizados por la empresa MacroGen® Corea. Para verificar la viabilidad de este protocolo, se realizó un ensayo de sensibilidad diagnóstica, en el cual la muestra con el menor número de parásitos según el análisis microscópico fue analizada mediante PCR convencional bajo un gradiente de concentraciones de ADN de 400, 200, 150, 100 y 50 ng. Sin embargo, debido a que el resultado obtenido no fue el esperado, la PCR convencional fue reemplazada por la PCR anidada descrita por Waldenström *et al.* (2004).

En el ensayo de PCR se utilizaron los reactivos del kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase y dNTP Mix® 10mM (Promega) así como, el termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA), donde las concentraciones y condiciones de la PCR se describen en la Tabla 4 y 5, respectivamente.

**Tabla 3**

*Cebadores para amplificar la región del citocromo B de los parásitos Haemoproteus spp. y Plasmodium spp.*

Cebador	Secuencia
HAEMNF	5-CATATATTAAGAGAATTATGGAG-3
HAEMNR2	5-AGAGGTGTAGCATATCTATCTAC-3
HAEMF	5- ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3
HAEMR2	5-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3

Fuente: (Bensch *et al.*, 2000; Waldenström *et al.*, 2004).

**Tabla 4**

*Composición del coctel de la PCR convencional para la detección de hemoparásitos del género Haemoproteus spp. y Plasmodium spp.*

Reactivos	Unidad	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Agua	μL	--	--	8.88
Buffer	X	5	1	5
MgCl <sub>2</sub>	mM	25	3	3
Cebador HAEMF	μM	10	0.6	1.5
Cebador HAEMR2	μM	10	0.6	1.5
dNTP	mM	10	0.4	1
Flexi Taq polimerasa	U/μL	5	0.625	0.125
ADN	ng/μL	--	--	4
<b>Total</b>				<b>25</b>

Fuente: Modificado de (Bensch *et al.*, 2000).

**Tabla 5**

*Programa de PCR anidada para amplificar la región del citocromo B de los parásitos Haemoproteus spp. y Plasmodium spp.*

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	35
Hibridación	50	30 seg	35
Extensión inicial	72	45 seg	35
Extensión final	72	10 min	1
	4	∞	--

Fuente: (Waldenström *et al.*, 2004)

### 3.2.9. Identificación de muestras positivas a *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp. mediante PCR anidada

Se siguió la metodología de PCR anidada descrita por Waldenström *et al.* (2004), que emplea a los cebadores HAEMNF y HAEMNR2 en la primera ronda de PCR, y a los cebadores HAEMF y HAEMR2 en la segunda ronda, los cuales se describen en la Tabla 3.

Al igual que con la PCR convencional, se llevó a cabo el ensayo de sensibilidad diagnóstica con la misma muestra y bajo un gradiente de concentraciones de ADN de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 y 0.39 ng. De este modo, en cada reacción de la primera PCR se incluyó aproximadamente 150 ng de ADN genómico (Tabla 6), y en la segunda PCR se agregó como molde 1  $\mu$ L del producto de la primera ronda de PCR (Tabla 7). Además en cada ensayo se incluyeron controles negativo (agua) y positivo (muestras HFC 034 y HFC 044, positivas para *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp.).

**Tabla 6**

*Composición del coctel de la primera ronda de PCR para la detección de hemoparásitos del género Haemoproteus spp. y Plasmodium spp. mediante la técnica de PCR anidada.*

Reactivos	Unidad	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu$ L)
Agua	$\mu$ L	--	--	11.38
Buffer Green GoTaq	X	5	1	5
MgCl <sub>2</sub>	mM	25	3	3
Cebador HAEMNF	$\mu$ M	10	0.6	1.5
Cebador HAEMNR2	$\mu$ M	10	0.6	1.5
dNTP	mM	10	0.4	1
Flexi Taq polimerasa	U/ $\mu$ L	5	0.625	0.125
ADN	ng/ $\mu$ L	100	150	1.5
<b>Total</b>				<b>25</b>

Fuente: Modificado de (Waldenström *et al.*, 2004).

**Tabla 7**

*Composición del coctel de la segunda ronda de PCR para la detección de hemoparásitos del género Haemoproteus spp. y Plasmodium spp. mediante la técnica de PCR anidada.*

Reactivos	Unidad	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Agua	μL	--	--	11.88
Buffer	X	5	1	5
MgCl <sub>2</sub>	mM	25	3	3
Cebador HAEMNF	μM	10	0.6	1.5
Cebador HAEMNR2	μM	10	0.6	1.5
dNTP	mM	10	0.4	1
Flexi Taq polimerasa	U/μL	5	0.625	0.125
Producto de PCR	ng/μL	--	--	1
<b>Total</b>				<b>25</b>

Fuente: Modificado de (Waldenström *et al.*, 2004).

Por otro lado, el programa de PCR para las dos rondas fue el mismo que se describió en la Tabla 5, con la peculiaridad que en la primera ronda, la desnaturalización, hibridación y extensión inicial fueron repetidas durante 20 ciclos, mientras que en la segunda fueron 35 ciclos.

### 3.2.10. Visualización de productos de PCR

La corrida electroforética se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v), preparado con 50 mL de buffer TBE 1X y teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) según la relación 0,1 μL/mL TBE 1X. En cada pocillo se cargó 10 μL de producto de PCR, dejando un pocillo libre para el marcador de peso molecular de 100 bp, se usó 3 μL de 100bp DNA Ladder Molecular Weight Marker (Promega™) con 3 μL de buffer de carga Green GoTaq Flexi 5X.

La fuente de poder fue configurada a 300 mA, 120 eV durante 75 minutos. Para visualizar el gel se empleó el transiluminador ENDURO™ UV Transilluminator U1001 y la cámara digital Sony DSC-W800, luego se editó la imagen en el programa FastStone Image Viewer.

Cuando una muestra presentó fragmentos inespecíficos, se recuperó el fragmento de ADN deseado después de la corrida electroforética y realizó una purificación del gel utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo el protocolo descrito en el kit.

### **3.2.11. Secuenciación**

La secuenciación de productos de PCR se realizó en la empresa MacroGen® Corea, mediante la técnica de Sanger, empleando los cebadores HAEMF y HAEMR2, descritos en la Tabla 7. Se envió 20 µL de cada muestra con una concentración de 100 ng/µL y se solicitó el servicio de síntesis de los cebadores para su secuenciación.

### **3.2.12. Ensamblaje de secuencias**

Las secuencias fueron ensambladas en el software Sequencher 5.4.6, mediante la observación de la calidad de los picos del cromatograma y la eliminación de los extremos de baja calidad. Las secuencias consenso de alta calidad de cada muestra, fueron guardadas en formato texto.

### **3.2.13. Análisis de similitud y homología**

Mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para nucleótidos, se compararon las secuencias consenso de los parásitos con la base de datos del GenBank y con la base de datos unificada de parásitos de la malaria aviar basados en los linajes del citocromo B mitocondrial (MalAvi) creada por Bensch *et al.* (2009), para determinar si los parásitos corresponden a los géneros *Haemoproteus* spp. o *Plasmodium* spp.

### 3.2.14. Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas fueron establecidas empleando 24 secuencias, detalladas en la Tabla 8. Entre ellas, las secuencias recuperadas por el análisis de similitud, previamente realizado, y las secuencias de hemoparásitos reportadas en la provincia de Morona Santiago que constaban en las bases de datos tanto del GenBank como del MalAvi, y que fueron producto de estudios realizados por Moens & Pérez-Tris (2015).

De este modo, mediante la herramienta Clustal W del programa DS Gene 1.5 se realizaron dos alineamientos múltiples, uno para *Plasmodium* spp. y otro para *Haemoproteus* spp., los cuales fueron guardados en formato FASTA. Posteriormente, empleando el software Mega 7, se obtuvieron los análisis filogenéticos mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo evolutivo Kimura 2 parámetros, utilizando una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios, y realizando 1000 repeticiones.

**Tabla 8**

*Secuencias de Plasmodium spp. y Haemoproteus spp. empleadas para el análisis filogenético, detallando su procedencia, número de acceso de GenBank y linaje asignado según MalAvi.*

Linaje según MalAvi	Género del Parásito	Origen		Número de acceso de GenBank
		Continente	País	
TASCH01	<i>Haemoproteus</i>	América del Norte	Estados Unidos	AY172843
BT7	<i>Plasmodium</i>	Europa	Suecia	AY393793
ICTCAY01	<i>Plasmodium</i>	América del Sur	Uruguay	DQ659545
ICTCAY01	<i>Plasmodium</i>	América del Norte	Estados Unidos	GQ141577
BT7	<i>Plasmodium</i>	América del Norte	Estados Unidos	GU252010
PADOM11	<i>Plasmodium</i>	Varios	Varios	HM146899
--	<i>Plasmodium</i>	América Central	Costa Rica	JN819332
--	<i>Plasmodium</i>	América Central	Costa Rica	JN819333
--	<i>Haemoproteus</i>	América Central	Costa Rica	JN819335
--	<i>Haemoproteus</i>	América Central	Costa Rica	JN819386
TANICT01	<i>Haemoproteus</i>	América Central	Costa Rica	JN819389
TRMUS01	<i>Haemoproteus</i>	América del Sur	Brasil	JX029918

Continúa



Linaje según MaAvi	Género del Parásito	Origen		Número de acceso de GenBank
		Continente	País	
LEPCOR01	<i>Plasmodium</i>	América del Sur	Perú	KF482355
TACRUB01	<i>Plasmodium</i>	América del Sur	Perú	KF482356
TANIG01	<i>Haemoproteus</i>	América del Sur	Colombia	KF537285
MYMAC02	<i>Haemoproteus</i>	América del Sur	Brasil	KP686097
EUXAN01	<i>Haemoproteus</i>	América del Sur	Ecuador	KT373860
LEPCOR04	<i>Plasmodium</i>	América del Sur	Ecuador	KT373874
TACCRI01	<i>Haemoproteus</i>	América del Sur	Brasil	KU562138
WILPOE09	<i>Plasmodium</i>	América del Sur	Brasil	KU562597
WILPOE09	<i>Plasmodium</i>	América del Sur	Brasil	KU562598
--	<i>Plasmodium</i>	Europa	Francia	KY801296
PADOM11	<i>Plasmodium</i>	América del Norte	Estados Unidos	MH177857
CYCGUJ01	<i>Plasmodium</i>	América del Sur	Brasil	MK695416

### 3.2.15. Análisis estadístico

Para analizar los resultados se utilizó el programa estadístico RStudio (Versión 1.1.456). De modo que, con un nivel de confianza del 95% para determinar si existen diferencias significativas entre la intensidad de infección de cada parásito y las zonas de estudio (Oglán Alto y Valle Hermoso) se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Mientras que para determinar la relación de dependencia entre la tasa de infección de cada parásito y las zonas de estudio se empleó la prueba de chi-cuadrado.

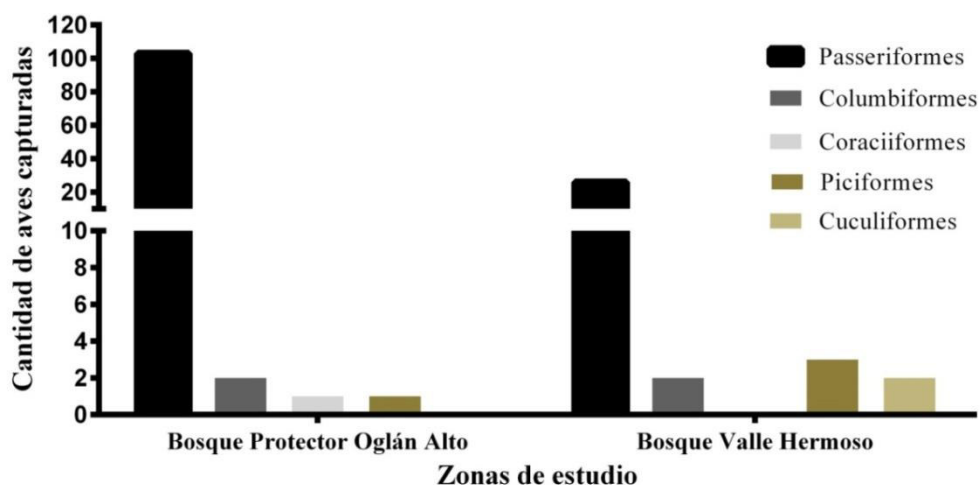
Adicionalmente, se calcularon las prevalencias de infección para cada sitio de estudio y se elaboraron gráficas de estadística descriptiva en el programa GraphPad Prism 6.

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Prevalencia de haemosporidios

En total, se capturaron 140 aves de 70 especies diferentes, 107 en el Bosque Protector Oglán Alto, incluyendo 103 passerines, y 33 en el Bosque de Valle Hermoso, incluyendo 26 passerines; de modo que en total 129 correspondieron al orden passeriformes, 4 al columbiformes, 1 al coraciiformes, 4 al piciformes y 2 al cuculiformes (Figura 17). Además, durante los últimos dos muestreos, 3 passerines fueron recapturados en el Bosque Protector Oglán Alto (Anexo B).

Aunque esta investigación tuvo como objetivo identificar la presencia de *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. en aves silvestres del orden passeriformes, los análisis se realizaron a todas las aves que fueron capturadas, no obstante los resultados de los no passerines se reportaron en el Anexo H.



**Figura 17.** Descripción de la cantidad de aves capturadas en función de su orden taxonómico, en los Bosques Protector Oglán Alto y Valle Hermoso.

En algunos casos, debido a la edad, tamaño y condición física del animal, la muestra tomada no fue suficiente para realizar el frotis sanguíneo y el análisis molecular. Por ello, en 2 passerines solo se realizó el análisis molecular, mientras que en 4 passerines solo el análisis microscópico (Anexo B, C).

En este estudio, el Bosque Protector Oglán Alto representa un hábitat continuo y no perturbado por el ser humano, al contrario del Bosque de Valle Hermoso, que representa un hábitat fragmentado, el cual es el resultado de un hábitat continuo desarticulado en varios fragmentos pequeños, que fueron separados para que el ser humano pueda usar esa tierra con diferentes fines (Rogan & Lacher, 2018), en este caso para la agricultura.

La prevalencia de malaria aviar (*Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp.) y la prevalencia de cada parásito en las dos zonas de estudio, fueron calculadas. En el Bosque de Valle Hermoso (Santo Domingo de los Tsáchilas) y en el Bosque Oglán Alto (Pastaza), se hallaron prevalencias de malaria aviar de 23.08% (6/26) y 3.96% (4/101) mediante microscopía, mientras que al emplear la técnica de PCR anidada, el nivel de detección aumentó llevando a prevalencias de 58.33% (14/24) y 16.83% (17/101), respectivamente.

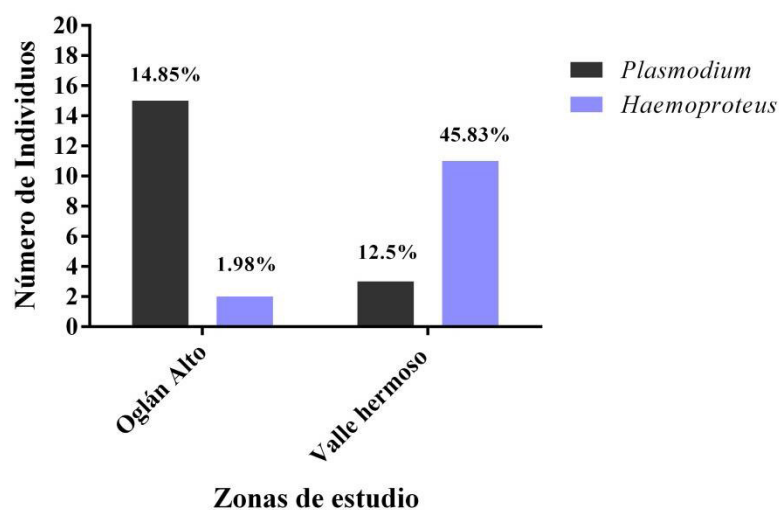
En la Tabla 9, se compararon los individuos diagnosticados con los parásitos *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp., empleando las técnicas de PCR anidada y microscopía. Aunque se observó que evidentemente la sensibilidad de detección de la técnica molecular es mayor a la técnica de microscopía, ambas técnicas son complementarias, ya que la observación de los frotis sanguíneos con el microscopio óptico permitió distinguir las etapas juveniles y adultas de los parásitos, y estimar la intensidad de infección en cada ave diagnosticada como positivo para malaria (Valkiūnas *et al.*, 2006).

**Tabla 9**

Comparación del número de aves diagnosticadas con los hemoparásitos *Plasmodium spp.* y *Haemoproteus spp.* mediante la técnica de PCR anidada y microscopía, en los Bosques de Oglán Alto y Valle Hermoso.

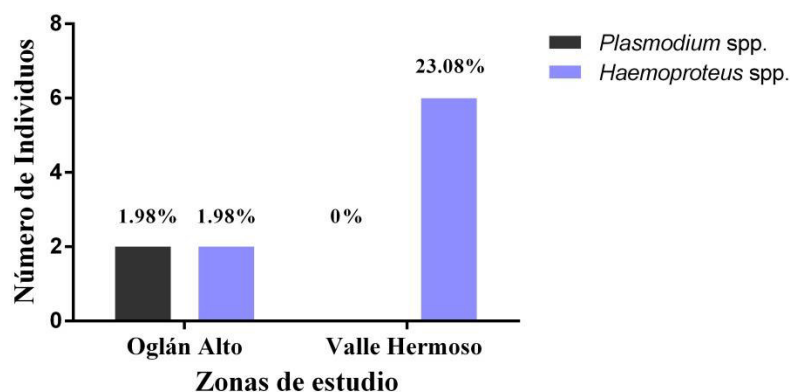
Zonas de estudio	<i>Plasmodium spp.</i>		<i>Haemoproteus spp.</i>	
	Microscopía	PCR anidada	Microscopía	PCR anidada
Bosque Protector Oglán Alto	2	15	2	2
Bosque de Valle Hermoso	0	3	6	11

Las prevalencias de los parásitos *Plasmodium spp.* y *Haemoproteus spp.*, determinadas mediante PCR anidada, en Oglán Alto, fueron de 14.85% (15/101) y 1.98% (2/101); mientras que así mismo, en Valle Hermoso, fueron de 12.5% (3/24) y 45.83% (11/24), tal como se muestra en la Figura 18.



**Figura 18.** Detección de los parásitos *Plasmodium spp.* y *Haemoproteus spp.* mediante la técnica de PCR anidada, en los Bosques Protector Oglán Alto y Valle Hermoso.

En contraste al analizar, las muestras mediante la técnica de microscopía los niveles de detección fueron menor, de modo que, las prevalencias de los parásitos *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. en Oglán Alto fueron de 1.98% (2/101) y 1.98% (2/101), mientras que en Valle Hermoso, fueron de 0% (0/26) y 23.08% (6/26), tal como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Detección de los parásitos *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. mediante la técnica de microscopía, en los Bosques Protector Oglán Alto y Valle Hermoso.

Por ambos métodos, se observó que la prevalencia de *Plasmodium* spp. es similar en ambos sitios de estudio, al contrario de *Haemoproteus* spp., cuya prevalencia fue mayor en Valle Hermoso en comparación a Oglán Alto.

Después de haber determinado el género del parásito causante de la infección de cada muestra, se elaboraron tablas de contingencia con los resultados de presencia y ausencia de infección para *Plasmodium* y *Haemoproteus*, respectivamente, mediante ambas técnicas de detección. Con ello, se pudo determinar estadísticamente que las infecciones producidas por *Plasmodium* spp. no estuvieron asociadas a las zonas con distinto grado de intervención humana (Chi cuadrado de Pearson, PCR:  $\chi^2 = 0.087$ ,  $p = 0.768$ ; Microscopía:  $\chi^2 = 0.5231$ ,  $p = 0.4495$ ;

$p > 0.05$ ), es decir, que su infección no depende de la intervención del ser humano, probablemente sea ya que una de las características más predominantes de *Plasmodium* spp. es ser cosmopolita (Valkiūnas, 2005). Mientras que las infecciones producidas por *Haemoproteus* spp. sí estuvieron relacionadas con las zonas de estudio (Chi cuadrado de Pearson, PCR:  $\chi^2 = 40.02$ ,  $p = 2.51 \times 10^{-10}$ ; Microscopía:  $\chi^2 = 15.59$ ,  $p = 7.86 \times 10^{-5}$ ;  $p < 0.05$ ), por ende la diferencia de prevalencias entre ambos sitios fue producida por la perturbación del ser humano.

Los resultados obtenidos constituyen el primer reporte sobre la infección de hemoparásitos, entre dos zonas con distinto grado de intervención humana, a nivel nacional y regional. En este contexto, la fragmentación de un hábitat debería producir una alteración en la dinámica de transmisión de un hemoparásito y facilitar el riesgo de infección, aumentando su prevalencia (Laurance *et al.*, 2013; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2018), lo cual se pudo evidenciar en Valle Hermoso, cuya prevalencia de *Haemoproteus* spp. fue mayor a Oglán Alto.

Estudios realizados en el Bosque de Oglán Alto, en los meses de julio y agosto de 2017, empleando solo la técnica de microscopía, reportaron una prevalencia de *Haemoproteus* spp. de 5.05% (5/99) y ausencia de infecciones por *Plasmodium* spp. (Mena, 2018). El haber realizado los muestreos en diferentes temporadas, podría explicar estos resultados, ya que, en este estudio los muestreos fueron llevados a cabo en los meses de diciembre de 2017, marzo y junio 2018, considerados dentro de la temporada más mojada de Arajuno, mientras que Mena (2018) lo hizo en la temporada más seca según el GAD de Arajuno (2014). La temporada de lluvia es determinante para la abundancia del vector y por ende para la prevalencia de infección de hemoparásitos, lo que explicaría la presencia de *Plasmodium* spp. en la temporada más mojada y su ausencia en la temporada más seca.

Las prevalencias en Oglán Alto (Pastaza) fueron similares a las reportadas en provincias limítrofes (Morona Santiago y Orellana), que emplearon en paralelo la técnica de microscopía y molecular. Moens & Pérez-Tris (2015) reportaron 15.81% (n=345) de prevalencia de malaria aviar en aves de Wisui, mientras que Svenson *et al.* (2013) reportaron una prevalencia promedio del 21.7% (n=2488) y una prevalencia mayor en *Plasmodium* (9.6%) que en *Haemoproteus* (6.4%), entre los años 2001 y 2010, en la estación de biodiversidad Tiputini. Además, Harrigan *et al.* (2014), reportaron 7.7% de prevalencia entre 1999 y 2004 al este de la cordillera de los Andes.

No existe ningún reporte en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, sin embargo un estudio similar en varias zonas del bosque fragmentado de la Reserva Mache Chindul (Esmeraldas) realizado por De Aguilar *et al.* (2018), reportó una prevalencia general de 9.13% (n=504), donde *Plasmodium* (5.35%) fue mayor a *Haemoproteus* (3.77%). El comportamiento de dichas prevalencias se asemejan más a Oglán Alto, debido a que el bosque fragmentado de la Reserva Macha Chindul, representa una huella de la agricultura que hubo en la zona varios años atrás, de modo que la salud del hábitat se encuentra en proceso de recuperación. Mientras que en Valle Hermoso, es una zona fragmentada que actualmente sigue siendo usada para cultivos.

Se encontró un estudio con las mismas variables que el llevado a cabo aquí, desarrollado en el bosque tropical de Australia, en el que se comparan la prevalencia entre un hábitat fragmentado y un sitio de bosque continuo; donde se halla que la prevalencia de *Haemoproteus* fue mayor a *Plasmodium* en el bosque continuo, mientras que las prevalencias de *Plasmodium* entre el hábitat fragmentado y el hábitat continuo fueron similares (Laurance *et al.*, 2013). Los resultados coinciden con los hallados aquí, posiblemente sea ya que las altitudes, entre el noreste

de Australia (600 – 900m) y Oglán Alto (500 – 1000m) son aproximadamente iguales, además de las condiciones de temperatura y clima.

Por otro lado, las diferencias entre las prevalencias reportadas en diferentes sitios, pueden tener varias explicaciones, ya que no existe un patrón definido. En primer lugar, la prevalencia de los hemoparásitos depende de la dinámica de transmisión parásito – huésped, que puede ser muy heterogénea y variar entre diferentes lugares (Roche & Guégan, 2011). En segundo lugar, una transmisión exitosa del parásito, se debe principalmente a la interacción entre las defensas inmunitarias del huésped (susceptibilidad) y las estrategias de explotación de parásito, como virulencia y plasticidad (García-Longoria *et al.*, 2019). Por otro lado, la prevalencia de un parásito y su éxito en la dinámica de transmisión depende de la abundancia del vector y del hospedero en un hábitat, lo que directamente está influido por la estructura abiótica que posea un ecosistema (Jones *et al.*, 2013; Renner *et al.*, 2016; Sehgal, 2015).

Al haber desarrollado este estudio en el Neotrópico, donde la precipitación en bosques tropicales, es una variable que favorece la prevalencia y parasitemia de haemosporidios debido a la mayor abundancia y actividad de los mosquitos (Hernández-Lara *et al.*, 2017), es posible que por este motivo la prevalencia de *Plasmodium* spp. haya sido mayor en Oglán Alto que en Valle Hermoso.

No existen registros de las comunidades de mosquitos transmisores de malaria aviar en Ecuador, que puedan respaldar las prevalencias halladas en este estudio. Sin embargo, al parecer en áreas protegidas como Oglán Alto (Pastaza), Tiputini (Orellana), Mache Chindul (Esmeraldas), que se localizan en regiones tropicales lluviosas, se ha visto favorecida la



prevalencia de *Plasmodium* sobre *Haemoproteus*, donde probablemente exista abundancia de los mosquitos culicidae.

La prevalencia de *Plasmodium* fue menor a *Haemoproteus* en Valle Hermoso, probablemente se deba a que los mosquitos culicidae influyeron en la distribución del parásito en las aves, ya que pueden actuar como filtro de compatibilidad para especies específicas de *Plasmodium* spp. en un sitio dado (Carlson *et al.*, 2015; Gangoso *et al.*, 2019). Es decir, que no todos los insectos que se alimentan de la sangre de aves infectadas poseen la capacidad de transmitir la enfermedad, sino que el éxito de la dinámica de transmisión parasitaria está directamente relacionada con la compatibilidad entre parásito y ave, y la compatibilidad entre parásito vector (Gangoso *et al.*, 2019).

La misma teoría podría justificar que la prevalencia de *Haemoproteus* se vea desfavorecida en el Bosque Oglán Alto en contraste con el Bosque fragmentado de Valle Hermoso, ya que Valkiūnas (2005), reporta que en un estudio con *Haemoproteus masoni*, un grupo de mosquitos culicoides fueron capaces de transmitir el parásito a los hospederos intermediarios, sin embargo, en otro grupo de mosquitos culicoides la transmisión no se llevó a cabo ya que el oocisto maduro no fue capaz de terminar su desarrollo; lo que sugiere que los parásitos de la malaria aviar tienen un desarrollo selectivo en vectores.

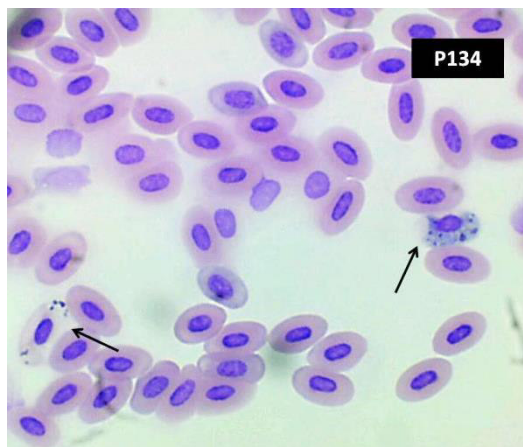
Desde otra perspectiva, que la prevalencia de *Haemoproteus* se vea favorecida en el Bosque fragmentado de Valle Hermoso, se puede deber en primer lugar a la posible abundancia de los mosquitos ceratopogonidae e hippoboscidae, que actúan como vectores (Jones *et al.*, 2013; Renner *et al.*, 2016; Sehgal, 2015). En segundo lugar, los hallazgos de Moens & Pérez-Tris (2015), sugieren que Sudamérica es rica en parásitos *Haemoproteus* más generalistas que en otras

regiones del mundo, razón por la cual existe una ventaja notable sobre la infección por *Plasmodium*. En tercer lugar, un hábitat fragmentado se caracteriza por cambios en las condiciones ambientales, la sobrepoblación de hospederos y por la introducción de nuevos parásitos y vectores (Fischer & Lindenmayer, 2007), lo que conduce a una mayor parasitemia en bosques fragmentados (Ogrzewalska *et al.*, 2011).

#### **4.2. Microscopía e intensidad de infección**

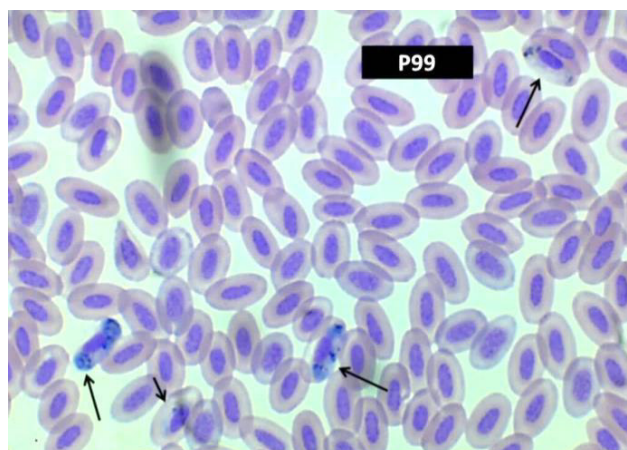
La identificación entre los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* mediante la técnica de microscopía óptica y el uso de la clave taxonómica elaborada por Valkiūnas y colaboradores (2018) no fue posible, ya que en ella se señala claramente que para diferenciar entre ambos parásitos, se debía decidir si es correspondiente al género *Plasmodium* al observar merontes eritrocíticos. De modo que, inicialmente las 10 muestras en las que se observaron gametocitos adultos (Figura 20, 21, Anexo E) fueron sospechosas para *Haemoproteus* spp.

Para corroborar que las muestras eran sospechas para *Haemoproteus*, se optó por la guía en claves antiguas (Valkiūnas, 2005) y en fotografías publicadas en artículos científicos (Valkiūnas & Iezhova, 2018; Valkiūnas *et al.*, 2018; Valkiūnas *et al.*, 2017), con lo cual, las muestras P50 y P86 fueron sospechosas para *Plasmodium* spp. del subgénero *Giovanolaia* o *Novyella*, ya que su forma es elongada, irregular y existe una separación entre el núcleo y el parásito; tras la PCR anidada y análisis de similitud se confirmó que en efecto fueron parásitos del género *Plasmodium*.



**Figura 20.** Observación de hemoparásitos adultos del género *Haemoproteus* en la muestra P134, confirmada molecularmente.

Nota: En el lado izquierdo se observa un microgametocito, y en el lado derecho un macrogametocito.



**Figura 21.** Observación de hemoparásitos adultos y juveniles del género *Haemoproteus* en la muestra P99, confirmada molecularmente.

Nota: En la esquina superior derecha se observa un microgametocito, mientras que en la parte inferior se observan dos macrogametocitos, y en el medio, mediante una flecha corta, un gametocito juvenil.

Por otro lado, la muestra P57 presentó parásitos juveniles (Figura 22), y al observar su forma se sospechó que estuvo infectada por algún linaje relacionado a *Plasmodium* del subgénero

Haemamoeba, la cual fue confirmada posteriormente en el análisis molecular. También se observaron parásitos juveniles en las muestras P96 y P113 (Anexo E), los cuales morfológicamente no permitieron la identificación de género pero mediante PCR anidada se pudo determinar que pertenecían al género *Plasmodium* spp.

Cuando una muestra tiene una baja intensidad parasitaria, la dificultad de encontrar merontes eritrocíticos aumenta (Valkiūnas, 2005), por ello, como se muestra la Tabla 9, las dos muestras que fueron confirmadas para *Plasmodium* spp. mediante PCR presentaron una baja intensidad parasitaria, por lo que la probabilidad de encontrar un meronte fue escasa.



**Figura 22.** Observación de sospechosos a gametocitos juveniles del género *Plasmodium* en la muestra P57, confirmado molecularmente.

Así, en total, se analizaron 130 frotis sanguíneos de passerines, 104 de Oglán Alto (incluyendo 3 recapturas) y 26 de Valle Hermoso, de las cuales el 3.96% (4/101) y el 23.08% (6/26) de las muestras, respectivamente, fueron diagnosticadas como positivas para la infección por hemoparásitos.

Después de haber determinado el género del parásito causante de la infección de cada muestra, se elaboraron tablas de contingencia con los resultados de presencia y ausencia de infección para *Plasmodium* y *Haemoproteus*. Con ello, se pudo determinar estadísticamente que

las infecciones producidas por *Plasmodium* spp. no estuvieron asociadas a las zonas con distinto grado de intervención humana (Chi cuadrado de Pearson,  $\chi^2 = 0.5231$ ,  $p = 0.4495$ ;  $p > 0.05$ ). Mientras que las infecciones producidas por *Haemoproteus* spp. sí estuvieron relacionadas con las zonas de estudio (Chi cuadrado de Pearson,  $\chi^2 = 15.59$ ,  $p = 7.86 \times 10^{-5}$ ;  $p < 0.05$ ).

La densidad parasitaria varió entre baja y muy alta, mientras que la intensidad de infección cuantificada en 10 000 eritrocitos varió entre 0.01% y 1.5% (Tabla 10). La intensidad de infección, tanto de *Plasmodium* spp. como *Haemoproteus* spp., no fue significativamente diferente entre ambos sitios de estudio (P: 4, Wilcoxon test,  $W = 18$ ,  $p = 0.09421$ ; H: 6, Wilcoxon test,  $W = 12$ ,  $p = 0.06513$ ).

En la muestra P118, detectada positiva por microscopía y PCR anidada, no se pudo determinar su linaje debido a la baja calidad de su secuencia. Sin embargo, la morfología de sus macro y microgametocitos son similares a la muestra P134 (Anexo E).

Los valores de intensidad de infección reportados en aves infectadas por *Haemoproteus* en Oglán Alto, son diferentes a los reportados por Mena (2018). Ya que en este estudio por primera vez se reporta infección por *Haemoproteus* spp. en los miembros de la familia Thraupidae y Fringillidae en Oglán Alto (provincia de Pastaza).

**Tabla 10**

*Densidad parasitaria e intensidad de infección de hemoparásitos del género Plasmodium spp. y Haemoproteus spp. en aves passeriformes en relación al sitio de estudio y especie, mediante la técnica de microscopía.*

Sitio	Muestra	Especie	Intensidad de infección		Densidad Parasitaria*	Número de parásitos
			<i>Plasmodium</i> spp. (%)	<i>Haemoproteus</i> spp. (%)		
Oglán Alto	P50	<i>Cyanoloxia cyanooides</i>	0.05	-	+	5
	P86	<i>Cryptopipo holochlora</i>	0.01	-	+	1
	P17	<i>Tangara schrankii</i>	-	0.75	+++	75
	P99	<i>Euphonia saturata</i>	-	1.5	++++	150
Valle Hermoso	P114	<i>Pheucticus aureoventris</i>	-	0.09	+	9
	P118	<i>Tangara episcopus</i>	-	0.04	+	4
	P122	<i>Ramphocelus icteronotus</i>	-	0.06	+	6
	P126	<i>Ramphocelus icteronotus</i>	-	0.06	+	6
	P129	<i>Sporophila angolensis</i>	-	0.03	+	3
	P134	<i>Myiodynastes maculatus</i>	-	0.31	+++	31

\*Interpretación: (+) parasitemia baja, (+ +) parasitemia media, (+ + +) parasitemia alta, (+ + + +) parasitemia muy alta.

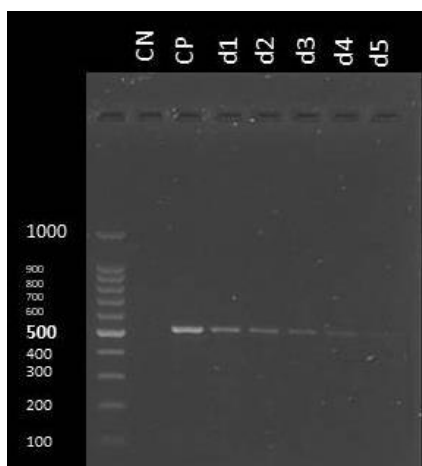
### 4.3. Análisis molecular

#### 4.3.1. Ensayo de sensibilidad diagnóstica de PCR convencional y PCR anidada

Desde finales del siglo XX, el citocromo B ha sido usado como marcador molecular para el análisis de relaciones evolutivas y diversidad genética (Arif & Khan, 2009) y actualmente continúa siendo empleado en muchos estudios. De modo que, los ensayos de sensibilidad diagnóstica para ambos tipos de PCR permitieron amplificar un fragmento de 478 pb del citocromo B, empleando la muestra P86, cuya intensidad de infección fue la menor (0.01%), al estar infectada por un parásito adulto y tres parásitos juveniles.

Con respecto a la PCR convencional, en la Figura 23, se puede observar que la intensidad del fragmento de 478 pb disminuyó acorde al gradiente de concentración, de modo que al llegar a 100 y 50 ng las bandas fueron casi imperceptibles. En contraste, en la PCR anidada (Figura 24),

la intensidad de las bandas a estas mismas concentraciones fueron intensas y muy perceptibles, pudiendo observar las bandas hasta una concentración de 1.56 ng.

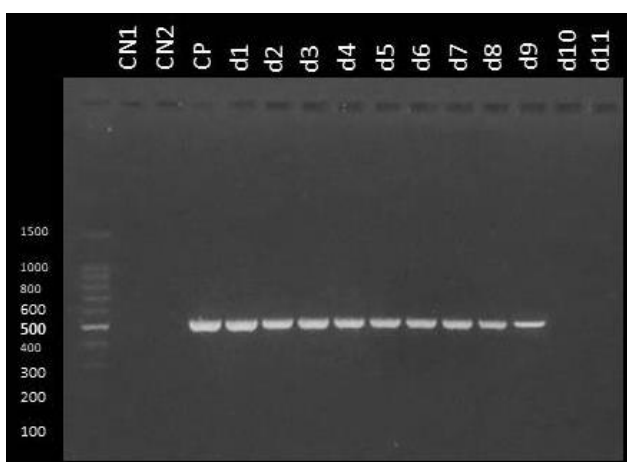


**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del gradiente de concentración de la muestra P86 para la estimación de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de PCR convencional.

Nota: Primer pocillo con el marcador molecular de 100 pb, CN: control negativo (agua), CP: control positivo (*Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp.) 80 ng de la muestra HFC 034, d1: 400 ng, d2: 200 ng, d3: 150 ng, d4: 100 ng; d5: 50 ng.

Al comparar la intensidad de las bandas obtenidas y la capacidad de amplificación entre cada técnica, se pudo determinar que la PCR anidada fue más sensible para la detección de hemoparásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus* en las muestras de passerines silvestres de los Bosques de Oglán Alto y Valle Hermoso, tal como lo demostró Bensch *et al.* (2004).

Aunque la técnica de PCR convencional, que emplea los cebadores HAEMF y HAEMR2 diseñados por Bensch *et al.* (2000), no fue útil en este ensayo, no significa que haya sido desplazada en la detección de la malaria aviar. Ya que, en el estudio realizado por Cadena (2015), cuyas muestras tuvieron una alta y muy alta intensidad parasitaria, la PCR convencional fue sensible para la detección de malaria aviar. En contraste, la PCR convencional no fue sensible en este estudio, ya que la mayoría de muestras tuvieron una baja intensidad de parasitemia o una parasitemia imperceptible a la luz del microscopio.



**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del gradiente de concentración de la muestra P86 para la estimación de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de PCR anidada.

Nota: Primer pocillo con el marcador molecular de 100 pb, CN1: control negativo (agua), CN2: control negativo primera ronda de PCR, CP: control positivo (*Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp.) amplicón de muestra HFC 034, d1: 400 ng, d2: 200 ng, d3: 100 ng, d4: 50 ng; d5: 25 ng, d6: 12.5 ng, d7: 6.25 ng, d8: 3.125 ng, d9: 1.56 ng, d10: 0.78 ng, d11: 0.39 ng.



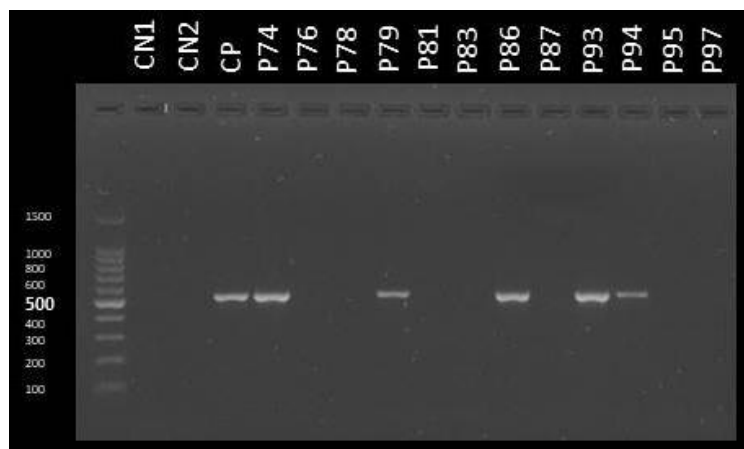
Al emplear PCR anidada en un ensayo de detección de malaria aviar existen dos ventajas, la reducción de la contaminación en los productos producidos por amplificaciones inespecíficas (Rahman *et al.*, 2013); y un aumento en la especificidad (81.2%) y sensibilidad (97.7%), demostrado en la detección de *P. vivax* en humanos (Genc *et al.*, 2010).

Por otro lado, para establecer la cantidad de ADN para realizar los análisis moleculares de todas las muestras, se observó que entre 200 y 100 ng la intensidad de la banda no varió (Figura 23), por lo que se estableció que la concentración aproximada de 150 ng de ADN genómico permitiría la detección de malaria aviar.

#### **4.3.2. Análisis molecular mediante PCR anidada**

En total, 128 muestras de passerines fueron analizadas molecularmente mediante la prueba de PCR anidada, 104 de Oglán Alto (incluyendo 3 recapturas) y 24 de Valle Hermoso. De las cuales 17 y 14 muestras, respectivamente, amplificaron el fragmento de 478 pb del citocromo B del ADN mitocondrial de los parásitos, tal como se puede observar en la Figura 25 y el Anexo D. De modo que en total, 31 muestras fueron positivas para la infección producida por al menos uno de los hemoparásitos de *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp.

Las 10 muestras que fueron determinadas como positivas mediante microscopía fueron confirmadas mediante la técnica de PCR anidada. Inclusive, debido a la alta sensibilidad de la prueba (Genc *et al.*, 2010), se pudo detectar infecciones en muestras que microscópicamente no presentaron hemoparásitos, de modo que, se triplicó el número de muestras diagnosticadas como positivo.



**Figura 25.** Corrida electroforética (1.5% agarosa) de las muestras analizadas mediante la técnica de PCR anidada.

Nota: Primer pocillo con el marcador molecular de 100 pb; CN1: control negativo (agua); CN2: control negativo primera ronda de PCR; CP: control positivo amplicón de muestra HFC 034 con 80 ng de ADN inicial; Muestras P74, P76, P78, P79, P81, P83, P86, P87, P93, P94, P95, P97.

Por otro lado, mediante la técnica de microscopía y PCR anidada, no se diagnosticó la presencia de hemoparásitos en las tres aves que fueron recapturadas en el Bosque Oglán Alto (*Automolus ochrolaemus*, *Contopus nigrescens*, *Cryptopipo holochlora*), es decir, que en el transcurso de 3 meses no hubo contacto ni se adquirió ningún hemoparásito.

#### **4.4. Caracterización de *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp.**

##### **4.4.1. Análisis de similitud de las secuencias obtenidas por la PCR anidada**

Después de haber realizado la secuenciación mediante el método de Sanger, en la empresa Macrogen, se obtuvieron 31 secuencias forward y 30 secuencias reverse de hemoparásitos provenientes de Oglán Alto y Valle Hermoso, cuyos cromatogramas fueron examinados en el software Sequencher 5.4.6. A partir de la secuencia forward y reverse de cada muestra, se obtuvo una secuencia consenso de alta calidad para su posterior análisis de similitud. La muestra P118,

solo contó con una secuencia forward de baja calidad, razón por la que no permitió establecer una secuencia confiable.

Las secuencias consenso obtenidas se compararon con secuencias conocidas de las bases de datos del GenBank y del MalAvi, mediante la herramienta de BLAST, con lo que se predijo el género del parásito y su respectivo linaje.

El GenBanK es una base de datos pública de secuencias de nucleótidos, creada por el NCBI en el 2004, donde cada entrada tiene un número de acceso, una descripción concisa de la secuencia, la taxonomía del organismo en donde fue hallada y el nombre del autor (Benson *et al.*, 2005). Actualmente, existen 213 millones de secuencias publicadas, por lo que existe la probabilidad de que diferentes autores ingresen una misma secuencia bajo dos nombres distintos. Como solución a esta problemática, en el año 2009, fue creada la base de datos unificada de parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) identificados por una región parcial de sus secuencias de citocromo b (Bensch *et al.*, 2009), la cual controla el ingreso de linajes repetitivos y en el caso del registro del aislado de un linaje, se asigna un linaje alternativo y se registra al mismo nivel que el linaje principal con su respectivo sitio de referencia.

En algunas ocasiones, fue preciso el uso de la Tabla de los nombres de linajes de la página del MalAvi, para una adecuada identificación del linaje o aislado.

Después de haber determinado el género del parásito causante de la infección de cada muestra, se elaboraron tablas de contingencia con los resultados de presencia y ausencia de infección para *Plasmodium* y *Haemoproteus*, respectivamente. Con ello, se pudo determinar

estadísticamente que las infecciones producidas por *Plasmodium* spp. no estuvieron asociadas a las zonas con distinto grado de intervención humana (Chi cuadrado de Pearson,  $\chi^2 = 0.087$ ,  $p = 0.768$ ;  $p > 0.05$ ). Mientras que las infecciones producidas por *Haemoproteus* spp. sí estuvieron relacionadas con las zonas de estudio (Chi cuadrado de Pearson,  $\chi^2 = 40.02$ ,  $p = 2.51 \times 10^{-10}$ ;  $p < 0.05$ ).

El análisis de similitud permitió encontrar la identidad de 15 muestras con un porcentaje de similitud de 100%, dentro de las cuales se identificaron 9 linajes de *Plasmodium* y *Haemoproteus*, tal como se observa en la Tabla 11.

Así, en Oglán Alto, se hallaron 6 linajes de *Plasmodium* y 1 de *Haemoproteus*: *Plasmodium* BT7 (P40, P69), *Plasmodium* LEPCOR04 (P86, P96), *Plasmodium* TACRUB01 (P49), PADOM11 (P50), *Plasmodium* LEPCOR01 (P84), *Plasmodium* idéntico a JN819385 (Archer *et al.*, datos no publicados) de la muestra P17, y *Haemoproteus* idéntico a KY801296 (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2018) de la muestra P79.

Mientras que en Valle Hermoso, se hallaron 2 linajes de *Plasmodium* y 1 de *Haemoproteus*: *Plasmodium* PADOM11 (P117, P119), *Plasmodium* idéntico a JN819331 (Archer *et al.*, datos no publicados) de la muestra P113, y *Haemoproteus* MYMAC02 (P134, P140).

**Tabla 11**

Resumen del resultado del análisis de similitud realizado en las bases de datos del GenBank y MalAvi para las 30 muestras obtenidas por la amplificación del citocromo B.

Sitio	Muestra	Género del parásito	Aislados según GenBank	Número acceso de GenBank	Porcentaje de identidad	Linaje según MalAvi (aislados)	Número acceso de GenBank	Porcentaje de identidad
Oglán Alto	P17	<i>Haemoproteus</i>	STTA23H	JN819335	100%	TASCH01	AY172843	100%
	P20	<i>Plasmodium</i>	WILPOE09	KU562597	99.1%	WILPOE09	KU562598	99%
	P40	<i>Plasmodium</i>	AMR.KGM64*	GU252010	100%	BT7	AY393793	100%
	P49	<i>Plasmodium</i>	TACHURIS01*	KF482356	100%	TACRUB01	KF482356	100%
	P50	<i>Plasmodium</i>	PADOM11	MH177857	99.8%	PADOM11	HM146899	100%
	P57, P67	<i>Plasmodium</i>	bird_sp.4*	GQ141577	99.8%	ICTCAY01	DQ659545	99%
	P69	<i>Plasmodium</i>	AMR.KGM64*	GU252010	99.79%	BT7	AY393793	100%
	P72, P74	<i>Plasmodium</i>	bird_sp.4*	GQ141577	99.79%	ICTCAY01	DQ659545	99%
	P79	<i>Plasmodium</i>	FRAG18	KY801296	100%	CYCGUJ01	MK695416	99%
	P84	<i>Plasmodium</i>	LEPIDO*	KF482355	100%	LEPCOR01	KF482355	100%
	P86, P96	<i>Plasmodium</i>	BCRM2	JN819332	100%	LEPCOR04	KT373874	100%
	P93, P94	<i>Plasmodium</i>	bird_sp.4*	GQ141577	99.79%	ICTCAY01	DQ659545	99%
	P99	<i>Haemoproteus</i>	STTA17H*	JN819389	99.79%	EUXAN01	KT373860	99%
Valle Hermoso	P112	<i>Haemoproteus</i>	WTTH2H	JN819386	99.58%	TACCRI01	KU562138	99%
	P113	<i>Plasmodium</i>	STTA8	JN819331	100%	ICTCAY01	DQ659545	99%
	P114	<i>Haemoproteus</i>	WTTH2H	JN819386	99.2%	TACCRI01	KU562138	99%
	P115, P122	<i>Haemoproteus</i>	WTTH2H	JN819386	99.4%	TACCRI01	KU562138	99%
	P117, P119	<i>Plasmodium</i>	PADOM11	MH177857	100%	PADOM11	HM146899	100%
	P120	<i>Haemoproteus</i>	STTA17H*	JN819389	99.58%	EUXAN01	KT373860	99%
	P126	<i>Haemoproteus</i>	WTTH2H	JN819386	99.6%	TRMUS01	JX029918	99%
	P129	<i>Haemoproteus</i>	WTTH2H	JN819386	99.8%	TRMUS01	JX029918	100%
	P134, P140	<i>Haemoproteus</i>	MYMAC02	KP686097	100%	MYMAC02	KP686097	100%
	P138	<i>Haemoproteus</i>	WTTH2H	JN819386	99.56%	TACCRI01	KU562138	99%

\*Sinónimos de los linajes principales hallados en la base de datos de MalAvi. STTA17H: TANICT01, AMR.KGM64: BT7, TACHURIS01: TACRUB01, bird\_sp.4: ICTCAY01, LEPIDO: LEPCOR01. En negrita:muestras que mostraron 100% de similitud en las bases de datos GenBank y MalAvi.

El parásito de *Plasmodium* PADOM11, fue común en ambos sitios de estudio, afectando a passerines de la familia Cardinalidae en Oglán Alto y de la familia Thraupidae en Valle Hermoso. En el país, este linaje parasitario, ya fue reportado en zonas fragmentadas de la Reserva Ecológica Mache Chindul (Esmeraldas) en miembros de la familia Emberizidae (De Aguilar *et al.*, 2018). Por otro lado, también ya ha sido reportado en passerines de países del Neotrópico como Brasil (Ferreira *et al.*, 2017; Lacorte *et al.*, 2013), Perú (Marzal *et al.*, 2011) y Guyana y Uruguay (Durrant *et al.*, 2006).

Dos linajes, *Plasmodium* BT7 y *Haemoproteus* idéntico a KY801296, se reportan por primera vez en la Amazonía ecuatoriana afectando a los passerines de la familia Turdidae (*C. minimus*, *C. ustulatus*) y Tityridae (*Schiffornis turdina*), respectivamente. *Plasmodium* BT7 no ha sido reportado en la región, aunque si ha sido reportado en passerines de Suecia (Hellgren *et al.*, 2004), en lechuzas norteñas y patos de Estados Unidos (Carlson *et al.*, 2018; Outlaw & Ricklefs, 2010). Mientras que el otro linaje, ha sido reportado únicamente en el camachuelo taurino de la familia Thraupidae, endémico de la región del Caribe y de la Isla Guadalupe (propiedad de Francia), ubicada en el mar Caribe, al sureste de República Dominicana (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2018).

Con respecto a los parásitos *Plasmodium* de los linajes LEPCOR01, LEPCOR04, TACRUB01, y a *Haemoproteus* linaje TASCH01, ya han sido reportados en la provincia de Morona Santiago, en la comunidad de Wisui (Moens & Pérez-Tris, 2015). En la provincia de Pastaza, se halló una *Tangara schrankii* infectada por el linaje TASCH01, tal como sucedió en Morona Santiago (Moens & Pérez-Tris, 2015) y en el zoológico de San Diego, USA (Schrenzel *et al.*, 2003), aunque también ha sido reportada en *Tangara icterocephala* en Costa Rica (Archer

*et al.*, datos no publicados). Mientras que los linajes LEPCOR01, LEPCOR04, TACRUB01 también han sido reportados en Brasil (Bosholn *et al.*, 2016; Fecchio *et al.*, 2017), Costa Rica (Archer *et al.*, datos no publicados), Perú (Marzal *et al.*, datos no publicados) infectando a *Lepidothrix. coronata* y *Tachuris rubrigastra*, al igual que ocurre en el estudio de Moens & Pérez-Tris (2015). Sin embargo, en Oglán Alto estos linajes infectaron a las aves de la familia Pipridae, tal como se encontró al Este de Brasil (Bosholn *et al.*, 2019).

En cuanto a las muestras de Valle Hermoso, por primera vez se reportó en Santo Domingo que un passerín de la familia Icteridae esté infectado con el linaje de *Plasmodium* idéntico a JN819331 (Archer *et al.*, datos no publicados), el cuál ha sido reportado en un ave de la familia Thraupidae en Costa Rica.

El linaje *Haemoproteus* MYMAC02, ha sido reportado en el parque de Mata Seca de Brasil, en el passerín *Myiodynastes maculatus* de la familia Tyrannidae (Ferreira *et al.*, 2017). No obstante, en este estudio se reportó por primera vez en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas-Ecuador, infectando también al passerín *Myiodynastes maculatus* y a otra ave de la familia Thraupidae.

En relación a las secuencias, que no mostraron un 100% de similitud con ninguna secuencia conocida de las bases de datos, y difirieron en al menos una sustitución de un nucleótido, se consideró que representaban linajes únicos.

Esta guía para reconocer linajes únicos en parásitos de la malaria aviar es usada ampliamente por varios investigadores (Cadena, 2015; De Aguilar *et al.*, 2018; Alan Fecchio *et al.*, 2013; Harrigan *et al.*, 2014; Moens & Pérez-Tris, 2015; Moens *et al.*, 2016), y se fundamenta

en los ensayos realizados por Bensch y colaboradores en el 2004, en el que se realizaron dos estudios en paralelo del citocromo B del ADN mitocondrial y de un gen nuclear de evolución relativamente rápida (DHFR-TS), propio de los haemosporidios. Lo que condujo a dos árboles genéticos congruentes y una aparente ausencia de recombinación para muchos linajes estrechamente relacionados, por lo que dichas secuencias similares del citocromo B representaban diferentes especies. No obstante, el mismo autor aclaró que, aunque se determinen diversos linajes que representan especies, no se debe tomar como evidencia de que todos dichos linajes son buenas especies. Ya que para demostrarlo, se requeriría un análisis de varios marcadores genéticos (Bensch *et al.*, 2009).

En total, 8 linajes nuevos fueron descubiertos, 3 en Oglán Alto y 5 en Valle Hermoso. A cada uno se le asignó un código con la abreviación de la especie del ave en la que fue encontrado el linaje, seguido de un número, siguiendo las indicaciones de MalAvi (Bensch *et al.*, 2009), tal como se muestra en la Tabla 12.

De modo que, en Oglán Alto se reportaron 8 linajes de *Plasmodium* y 2 linajes de *Haemoproteus*, mientras que en Valle Hermoso, se reportaron 2 linajes de *Plasmodium* y 6 linajes de *Haemoproteus*. De los cuales, en ambos sitios de estudio, se halló un hemoparásito en común *Plasmodium* PADOM11.



**Tabla 12**

*Nombres asignados a los linajes únicos de Plasmodium spp. y Haemoproteus spp. hallados en los Bosques del Oglán Alto y Valle Hermoso.*

Sitio	Número de muestra	Parásito	Linaje asignado	Género	Especie
Oglán Alto	P20	<i>Plasmodium</i>	WILPOE22	<i>Willisornis</i>	<i>poecilnotus</i>
	P57, P67, P72, P74, P93, P94	<i>Plasmodium</i>	CYACYA06	<i>Cyanoloxia</i>	<i>cyanoides</i>
	P99	<i>Haemoproteus</i>	EUPHOSA01	<i>Euphonia</i>	<i>saturata</i>
Valle Hermoso	P112, P114	<i>Haemoproteus</i>	PHAURE01	<i>Pheucticus</i>	<i>aureoventris</i>
	P115, P122, P138	<i>Haemoproteus</i>	RAMICT01	<i>Ramphocelus</i>	<i>icteronotus</i>
	P120	<i>Haemoproteus</i>	SALMAX03	<i>Saltator</i>	<i>maximus</i>
	P126	<i>Haemoproteus</i>	RAMICT02	<i>Ramphocelus</i>	<i>icteronotus</i>
	P129	<i>Haemoproteus</i>	SPOANG01	<i>Sporophila</i>	<i>angolensis</i>

#### 4.4.2. Análisis filogenético de secuencias del citocromo B

Se establecieron relaciones filogenéticas de los linajes de *Plasmodium* y *Haemoproteus* reportados en Ecuador, Perú, Colombia, Brasil, Uruguay, Costa Rica, Estados Unidos, Francia, Suecia, y los linajes obtenidos en el presente estudio. Los análisis para *Plasmodium* y *Haemoproteus* involucraron 34 y 21 secuencias de nucleótidos, respectivamente, con 458 posiciones que conformaron el conjunto final de datos.

La importancia de haber realizado una inferencia filogenética entre los linajes de los parásitos de la malaria aviar, consistió en monitorear a los parásitos que amenazan la conservación de especies endémicas de aves del país. Ya que, Ecuador hasta el año 2017, albergó a 1679 especies de aves passeriformes, que representó casi el 17% de las especies a nivel mundial (Freile *et al.*, 2017).

Si bien es cierto, cuando un parásito ha coevolucionado junto a su hospedero no existen efectos letales sobre ellos. Sin embargo, cuando se pone en contacto a un ave con un nuevo

parásito, si existe abundancia de vectores, condiciones favorables y compatibilidad del vector con el parásito (Carlson *et al.*, 2015; Gangoso *et al.*, 2019; Valkiūnas, 2005), las consecuencias podrían ser graves, así como el caso reportado por Atkinson *et al.* (2000), de *Plasmodium relictum* en el bosque de Hawaii a inicios del siglo XX.

La propagación de parásitos en nuevas regiones puede ser facilitada por las mismas aves, ya que sus hábitos migratorios entre continentes los expone a numerosos vectores, capaces de transmitir patógenos. De modo que, pueden conectar a las comunidades de haemosporidios aviáres de las zonas templada y tropical (Ricklefs *et al.*, 2017).

#### **4.4.2.1. Relaciones filogenéticas entre linajes de *Haemoproteus***

La historia evolutiva para los linajes de *Haemoproteus* se dedujo empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Kimura 2 parámetros, mostrándose el árbol con mayor probabilidad de registro en la Figura 26, en donde se consideró como outgroup a una secuencia de *Plasmodium*.

Se pudo observar la formación de 3 clados principales, con un buen nivel de confianza para su formación en el árbol filogenético, ya que los valores de soporte fueron 93%, 98%, y 100%.

El primer clado fue compuesto por los linajes TACCRI01, TRMUS01 y los linajes únicos descubiertos en el presente estudio RAMICT01, RAMICT02, PHAURE01, SPOANG01. El linaje SPOANG01 demostró una relación más cercana al linaje TRMUS01, ya que ambas parten del mismo nodo.

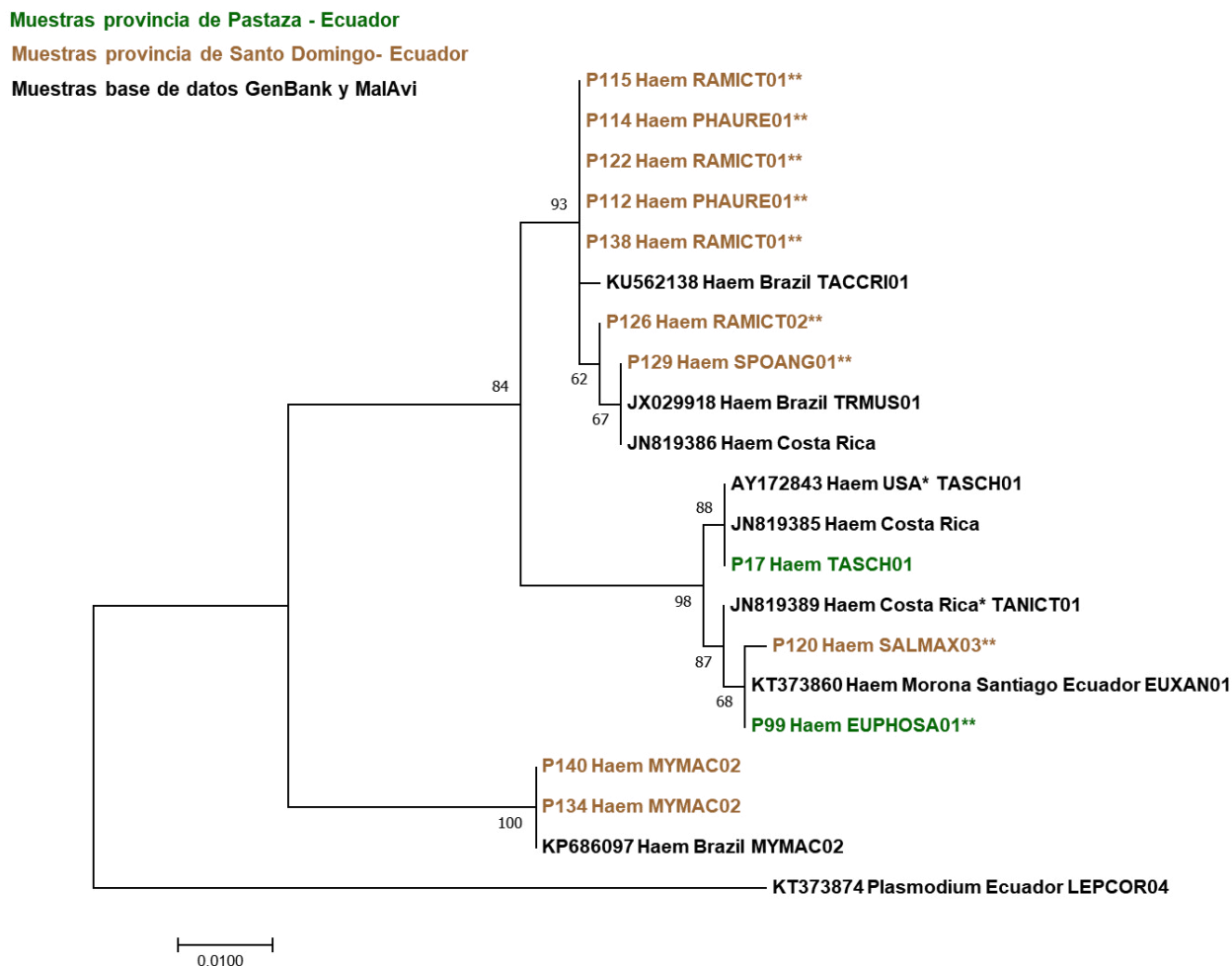
En el caso de PHAURE01 y RAMICT01, aunque también demuestren tener una relación muy cercana y sus secuencias son bastante similares, se sospecha que *Haemoproteus* PHAURE01

es un parásito introducido originario de Sudamérica, ya que se reportó en los passerines extensamente migratorios *Pheucticus aureoventris* (muestra P112 y P114), que se extienden por el centro de Sudamérica (IUCN, 2019). Mientras que RAMICT01, se reportó en los passerines no migratorios *Ramphocelus icteronotus*.

En el segundo clado, se observó la división en dos subclados, cuyos nodos presentaron una buena robustez. Uno compuesto por el taxón del linaje TASCH01, que fue reportado en Estados Unidos, Morona Santiago - Ecuador, y en la provincia de Pastaza.

Mientras que el otro subclado, estuvo compuesto por los linajes TANICT01, EUXAN01 y los linajes únicos SALMAX03 y EUPHOSA01. La topología mostrada entre los linajes EUXAN01 y TASCH01, fue similar al reportado por Moens & Pérez-Tris (2015) mediante un análisis bayesiano. El linaje EUPHOSA01 demostró una relación más cercana al linaje EUXAN01, al mismo tiempo que ambos fueron reportados en passerines del género *Euphonia* de la familia Fringillidae, de donde posiblemente evolucionó el linaje EUPHOSA01.

El tercer clado fue compuesto por el taxón del linaje MYMAC02, que fue reportado por en Brasil en el passerín extensamente migratorio *Myiodynastes maculatus*. Según la página del IUCN (2019), dicha ave se extiende por Centroamérica y el norte de Sudamérica (incluyendo a Brasil y Ecuador). La muestra P134 correspondió al passerín *Myiodynastes maculatus*, el cual al migrar pudo contagiarse con *Haemoproteus* MYMAC02 y en su paso por Ecuador, contagió al ave *Tangara nigroviridis* (muestra P140). De modo que, por primera vez se reporta este parásito en el país, en Bosque Valle Hermoso, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.



**Figura 26.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de *Haemoproteus* spp. basados en las secuencias de una región del citocromo B.

Nota: Los números indican los valores de soporte (%), estimados de las 1000 repeticiones. Los linajes reportados también en Ecuador se representan con (\*), mientras que los linajes únicos descubiertos en este estudio se representan con (\*\*).

#### 4.4.2.2. Relaciones filogenéticas entre linajes de *Plasmodium*

La historia evolutiva para los linajes de *Plasmodium* se dedujo empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Kimura 2 parámetros, mostrándose el árbol con

mayor probabilidad de registro en la Figura 27, en donde se consideró como outgroup a una secuencia de *Haemoproteus*.

Se pudo observar la formación de 6 clados principales con un buen nivel de confianza, ya que los valores de soporte fueron de 99% para la mayoría, aunque el primero presentó 98% y el tercero 92%. Además, se pudo observar que el sexto clado es más antiguo que el resto de clados, mientras que el tercer clado es el más nuevo.

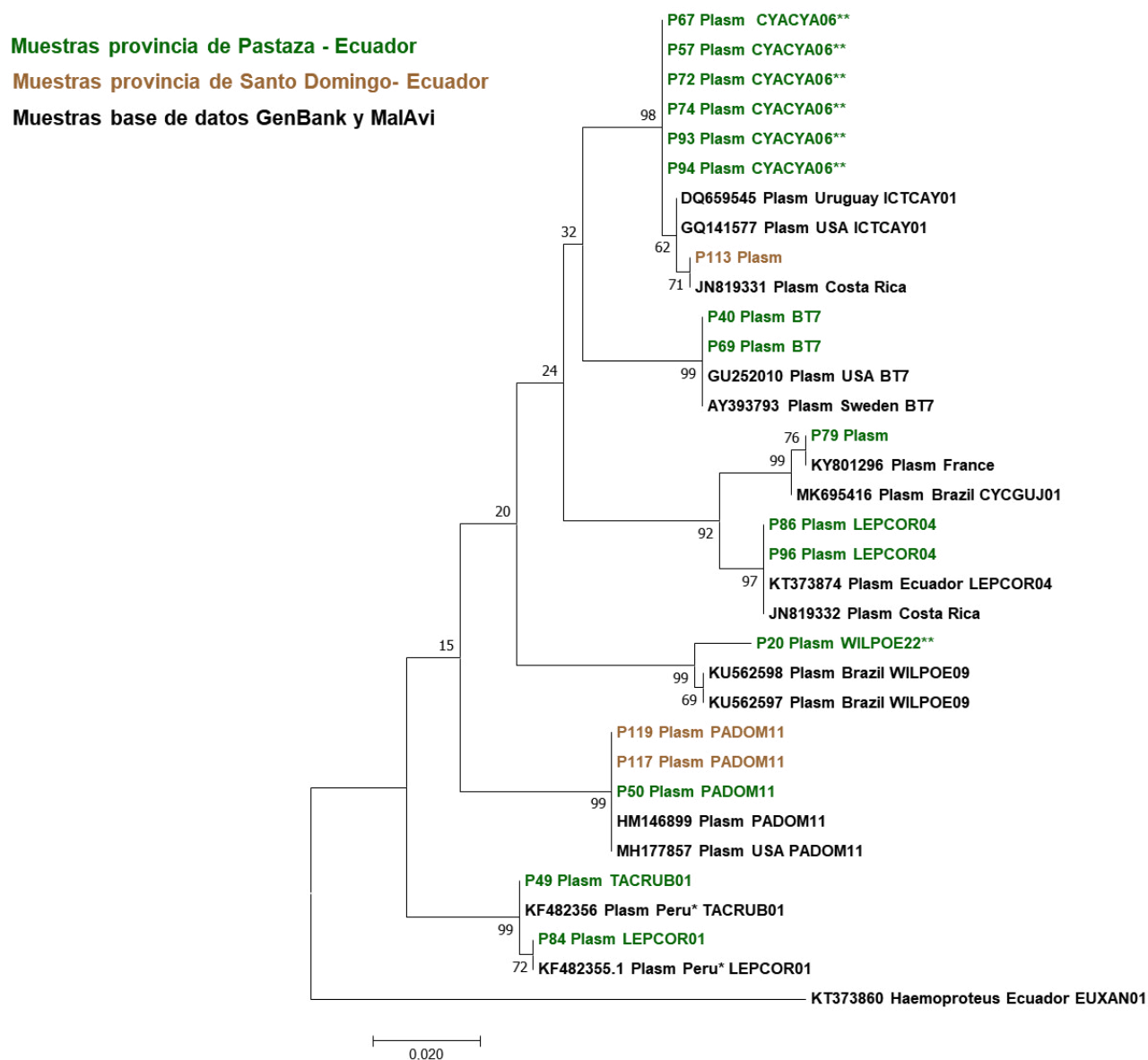
Según Harrigan *et al.* (2014), es normal que los clados para *Plasmodium* sean más diversos, ya que poseen la capacidad de infectar a numerosos hospederos, por ello en comparación al árbol filogenético de *Haemoproteus*, se observó mayor número de ramificaciones para *Plasmodium*.

El primer clado fue compuesto por el linaje ICTCAY01 y el linaje único CYACYA06. El parásito *Plasmodium* CYACYA06, se reportó en passerines no migratorios (*Cyanoloxia cyanooides*, *Glyphorynchus spirurus*) y se pudo observar que se asemeja más al linaje ICTCAY01, aunque este último es más actual que CYACYA06. Adicionalmente, se observó la formación de un subclado, en el que se encontraron agrupados el linaje de la muestra P113 y la secuencia sin publicar de Archer *et al.*

El segundo clado fue compuesto por el taxón del linaje BT7, el cual ha sido reportado en los continentes de Europa, Asia, América del Norte, y América Central (Costa Rica), según los registros en la Tabla de sitios y hospederos de la página de MalAvi.

En este estudio, dicho parásito se halló infectando a dos passerines del género *Catharus* de la familia Turdidae, los cuales según la página del IUCN (2019), son aves extensamente migratorias que se extienden en la parte norte de Sudamérica, América del Norte, y Rusia. De

modo que se sospecha que *Plasmodium* BT7 es un parásito introducido originario del Hemisferio Norte.



**Figura 27.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de *Plasmodium* spp. basados en las secuencias de una región del citocromo B.

Nota: Los números indican los valores de soporte (%), estimados de las 1000 repeticiones. Los linajes reportados también en Ecuador se representan con (\*), mientras que los linajes únicos descubiertos en este estudio se representan con (\*\*).

En el tercer clado, se observó la división en dos subclados, cuyos nodos presentaron una buena robustez (99% y 97%). Uno compuesto por el taxón del linaje LEPCOR04 y otro con linajes relacionados a CYCGUJ01.

En aquel que incluyó el linaje CYCGUJ01, se observó un nodo interno que relacionó a los parásitos de *Schiffornis turdina* (muestra P79), residente del norte de Sudamérica y *Loxigilla noctis* (linaje KY801296), endémico del caribe. Ambos passerines son no migratorios según el IUCN (2019), razón por la cual no se encontró una explicación para que dicho linaje de *Plasmodium* esté presente en la provincia de Pastaza.

Mientras que el otro subclado, estuvo compuesto por el taxón del linaje LEPCOR04, el cual ha sido reportado solo en Sudamérica (Morona Santiago - Ecuador, Brasil, Perú) según los registros en la Tabla de sitios y hospederos de la página de MalAvi. La familia de aves en la que más ha sido reportado *Plasmodium* LEPCOR04, fue la familia Pipridae según MalAvi (2019), cuyos miembros se caracterizan por no ser migrantes (IUCN, 2019). Así, en *Ceratopipra erythrocephala* (muestra P96) ya fue reportado este parásito en estudios en Brasil (Fecchio *et al.*, 2017), mientras que en *Cryptopipo holochlora* (muestra P86) es la primera vez que se reporta una infección por este parásito.

El cuarto clado estuvo formado por el taxón del linaje WILPOE09, el cual ha sido reportado solo en Brasil (Fecchio *et al.*, 2018), infectando a *Willisornis poecilnotus*, un passerín no migrante (IUCN, 2019). En este estudio, el ave de la muestra P20 correspondió a la misma especie, sin embargo, el linaje parasitario no correspondió, ya que como se observa el linaje único WILPOE22 es más actual y evolucionado que WILPOE09.

El quinto clado fue conformado por el taxón del linaje PADOM11, el cual ha sido reportado en Sudamérica (Ecuador, Brasil, Perú, Guyana, Uruguay) y América del Norte (IUCN, 2019). Este clado mostró una topología similar al estudio realizado por De Aguilar *et al.* (2018).

Finalmente, el sexto clado fue conformado por los linajes reportados TACRUB01 y LEPCOR01, cuya topología fue similar a estudios realizados previamente (De Aguilar *et al.*, 2018; Moens & Pérez-Tris, 2015). En Oglán Alto, *Plasmodium* LEPCOR01 infectó a *Cryptopipo holochlora* (P84), passerín no migrante, miembro de la familia Pipridae. Según MalAvi (2019), este parásito afecta comúnmente a los miembros de esta familia y ha sido reportado en Sudamérica (Morona Santiago – Ecuador y Perú).

En cuanto a *Plasmodium* TACRUB01, ha sido reportado en Ecuador (Morona Santiago) y Brasil en passerines no migrantes, afectando principalmente a la familia Pipridae (MalAvi, 2019). Sin embargo, existen reportes en Perú en el passerín extensamente migrante *Tachuris rubrigastra*, que se extiende en Sudamérica. En este estudio se encontró este parásito afectando al ave, no migrante, *Chiroxiphia pareola* (muestra P49), miembro de la familia Pipridae.

Los linajes que no mostraron rastro de haber sido propagados por aves migratorias, probablemente hayan sido producto de una radiación adaptativa. Ya que, estudios reportan que los hemoparásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus* poseen altas tasas de evolución en sus genes del ADN mitocondrial, como resultado de procesos evolutivos a nivel comunitario entre sus hospederos y vectores (Pacheco *et al.*, 2018).



## CAPITULO V: CONCLUSIONES

Las infecciones producidas por *Plasmodium* spp. no estuvieron asociadas a las zonas de estudio ( $p>0.05$ ), mientras que las infecciones por *Haemoproteus* spp. sí estuvieron asociadas a cada zona con diferente grado de intervención humana ( $p<0.05$ ).

Las prevalencias de aves infectadas por *Plasmodium* spp. en el bosque continuo Oglán Alto y el bosque fragmentado Valle Hermoso fueron 14.85% y 12.5%, mientras que para *Haemoproteus* spp. fueron 1.98% y 45.83%, respectivamente.

La PCR convencional no permitió la detección de infecciones por hemoparásitos del género *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. en aves silvestres de los bosques Valle Hermoso y Oglán Alto, por lo que fue reemplazada por una PCR anidada que demostró ser más sensible en la detección de malaria aviar.

La caracterización de linajes de hemoparásitos mediante secuenciación permitió la identificación de 9 linajes de *Plasmodium* y *Haemoproteus* previamente reportados. Además del hallazgo de 2 linajes nuevos de *Plasmodium* y 6 linajes nuevos de *Haemoproteus* en las provincias de Pastaza y Santo Domingo de los Tsáchilas.

## CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

Aun cuando la técnica de microscopía no posea un alto nivel de sensibilidad en la detección de hemoparásitos, se recomienda seguirla empleando paralelamente a las técnicas moleculares. Ya que permitió la estimación de la intensidad de infección parasitaria y la distinción de estados juveniles y adultos en las muestras analizadas.

La detección de infecciones mixtas, mediante el análisis meticuloso de electroferogramas en las muestras analizadas no fue posible en este ensayo. Por ello se recomienda, el uso de enzimas de restricción, un método sencillo y económico.

Para asegurar la obtención de una secuenciación de alta calidad, se recomienda emplear el primer HAEMR2, ya que debido a la gran diversidad de parásitos de la malaria aviar, en varias secuencias se pudo observar que el primer HAEMF no se alineó completamente.

En futuras investigaciones, se recomienda determinar la presencia de los parásitos de la malaria aviar en las poblaciones de mosquitos de las familias culicidae (vectores de *Plasmodium* spp.) y ceratopogonidae e hippoboscidae (vectores de *Haemoproteus* spp.) del Ecuador.

**CAPITULO VII: REFERENCIA BIBIOGRÁFICA**

- Santiago-Alarcón, D., Carbó-Ramírez, P. (2015). Parásitos Sanguíneos De Malaria Y Géneros Relacionados (Orden: Haemosporida) En Aves De México: Recomendaciones Metodológicas Para Campo Y Laboratorio. *Ornitología Neotropical*, 26, 59–77.
- Santiago-Alarcon, D., Outlaw, D., Ricklefs, R., Parker, P. (2010). Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in New World Columbiformes, with emphasis on the endemic Galapagos dove. *International Journal for Parasitology*, 40(4), 463–470. doi:10.1016/j.ijpara.2009.10.003
- Alger, J. (2001). Densidad Parasitaria en Malaria: Métodos de determinación y su interpretación. *Rev Med Hond*, 69, 118–120.
- Allander, K.. (1997). Reproductive investment and parasite susceptibility in the Great Tit. *Functional Ecology*, 11(3), 358–364. doi: 10.1046/j.1365-2435.1997.00095.x
- Araújo, A., Jansen, A., Bouchet, F., Reinhard, K., Ferreira, L. (2003). Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(SUPPL. 1), 5–11. doi: 10.1590/S0074-02762003000900003
- Arif, I., Khan, H.. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9.
- Asghar, M., Hasselquist, D., Westerdahl, H., Hansson, B., Zehtindjiev, P., Bensch, S. (2015). Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science*, 347(6220), 436–438. doi: 10.1126/science.1261121
- Atkinson, C., Van Riper III, C. (1991). Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa:

*Plasmodium*, Leucocytozoan, and *Haemoproteus*. *Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution, and Behaviour*, 19–48. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.12.027

Atkinson, C., Dusek, R., Woods, K., Iko, W. (2000). Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(2), 197-204. doi: 10.7589/0090-3558-36.2.197

Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Östman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., Torres, R. (2000). Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1452), 1583–1589. doi: 10.1098/rspb.2000.1181

Bensch, S., Hellgren, O., Pérez, J. (2009). MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1353–1358. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x

Benson, D., Karsch-Mizrachi, L., Lipman, D., Ostell, J., Wheeler, D. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33, 94–99. doi: 10.1093/nar/gky989

Bernotienė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T., Murauskaitė, D., Valkiūnas, G. (2016). Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. *Experimental Parasitology*, 163, 31–37. doi: 10.1016/j.exppara.2016.01.009

Bosholn, M., Anciães, M., Gil, D., Weckstein, J., Dispoto, J., Fecchio, A. (2019). Individual variation in feather corticosterone levels and its influence on haemosporidian infection in a Neotropical bird. *International Journal of Avian Science*. doi: 10.1111/ibi.12709

- Bosholn, M., Fecchio, A., Silveira, P., Braga, E., Anciães, M. (2016). Effects of avian malaria on male behaviour and female visitation in lekking blue-crowned manakins. *Journal of Avian Biology*, 47(4), 457–465. doi: 10.1111/jav.00864
- Bravo, E. (2013). Apuntes sobre la biodiversidad del Ecuador. Cuenca, Ecuador: Editorial Universitaria Abya-Yala. Pág. 7.
- Brown, J. (2013). Why are there so many species in the tropics? *Journal of Biogeography*, 41(1), 8–22. doi: 10.1111/jbi.12228
- Cadena, H. (2015). Malaria Aviar en los Chingolos (*Zonotrichia capensis*) del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador.
- Cajamarca, P. (2018). Elaboración de una guía fotográfica de aves comunes de la Estación Científica Juri Juri Kawsay, para potenciar el aviturismo en el cantón Arajuno Proyecto de Investigación.
- Carlson, J., Walther, E., Troutfryxell, R., Staley, S., Tell, L., Sehgal, R., Barker, C., Cornel, A. (2015). Identifying avian malaria vectors: Sampling methods influence outcomes. *Parasites and Vectors*, 8(1). doi: 10.1186/s13071-015-0969-0
- Carlson, M., Proudfoot, G., Gentile, K., Dispoto, J., Weckstein, D. (2018). Haemosporidian prevalence in northern saw-whet owls *Aegolius acadicus* is predicted by host age and average annual temperature at breeding grounds. *Journal of Avian Biology*, 49(11). doi: 10.1111/jav.01817
- Clark, N., Clegg, S., Lima, M. (2014). A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): New insights from molecular data.

*International Journal for Parasitology*, 44(5), 329–338. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.01.004

Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A., Gandon, S. (2013a). Both infected and uninfected mosquitoes are attracted toward malaria infected birds. *Malaria Journal*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-179>

Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A., Gandon, S. (2013b). Malaria infection increases bird attractiveness to uninfected mosquitoes. *Ecology Letters*, 16(3), 323–329. doi: 10.1111/ele.12041

Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A., Gandon, S. (2014). Evolution of Plastic Transmission Strategies in Avian Malaria. *PLoS Pathogens*, 10(9). doi: 10.1371/journal.ppat.1004308

Daszak, P., Cunningham, A., Hyatt, A. (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, 287(287), 443–449. doi: 10.1126/science.287.5452.443

De Aguilar, J., Castillo, F., Moreno, A., Peñafiel, N., Browne, L., Walter, S., Karubian, J., Bonaccorso, E. (2018). Patterns of avian haemosporidian infections vary with time, but not habitat, in a fragmented Neotropical landscape. *PLoS ONE*, 13(10), 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0206493

Dickinson, E., Christidis, L. (2014). *The Howard & Moore Complete Checklist of the Birds of the World*. Eastbourne, United Kingdom: Editorial Aves Press Ltd.

Dobson, A., Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411), 1001–1012. doi: 10.1098/rstb.2001.0900

- Durrant, K., Beadell, J., Ishtiaq, F., Graves, G., Olson, S., Gering, E., Peirce, M., Milensky, C., Schmidt, B., Gebhard, C., Fleischer, R. (2006). Avian Hematozoa in South America: A Comparison of Temperate and Tropical Zones. *Ornithological Monographs*, (60), 98–111. doi: 10.2307/40166831
- Edwards, S., Harshman, J. (2013). Passeriformes: Perching Birds, Passerine Birds. Tree of life. Obtenido de <https://www.tolweb.org>
- Fallon, S., Bermingham, E., Ricklefs, R. (2003). Island and Taxon Effects in Parasitism Revisited: Avian Malaria in the Lesser Antilles. *Evolution*, 57(3), 606–615. doi: 10.1554/0014-3820(2003)057[0606:IATEIP]2.0.CO;2
- Fecchio, A., Lima, M., Silveira, P., Ribas, A., Caparroz, R., Marini, M. (2014). Age, but not sex and seasonality, influence Haemosporida prevalence in White-banded Tanagers ( *Neothraupis fasciata* ) from central Brazil . *Canadian Journal of Zoology*, 93(1), 71–77. doi: 10.1139/cjz-2014-0119
- Fecchio, A., Lima, M., Svensson-Coelho, M., Marini, M., Ricklefs, R. (2013). Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. *Parasitology*, 140(2), 181–192. doi: 10.1017/S0031182012001412
- Fecchio, A., Pinheiro, R., Felix, G., Faria, I., Pinho, J., Lacorte, G., Braga, E., Frias, I., Aleixo, A., Tkach, V., Collins, M., Bell, J., Weckstein, J. (2018). Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. *Ecography*, 41(3), 505–515. doi: 10.1111/ecog.03058
- Fecchio, A., Svensson-Coelho, M., Bell, J., Ellis, V., Medeiros, M., Trisos, C., Blake, J., Loiselle,

- B., Tobias, J., Fanti, R., Coffey, E., De Faria, I., Pinho, J., Felix, G., Braga, E., Anciães, M., Tkach, V., Bates, J., Witt, C., Weckstein, J., Ricklefs, R., Farias, I. (2017). Host associations and turnover of haemosporidian parasites in manakins (Aves: Pipridae). *Parasitology*, *144*(7), 984–993. doi: 10.1017/S0031182017000208
- Feldman, R., Freed, L., Cann, R. (1995). A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology*, *4*(6), 663 - 673. doi: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00267.x
- Ferreira, F., Rodrigues, R., Ellis, V., Leite, L., Borges, M., Braga, E. (2017). Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributions in southeastern Brazil. *PLoS ONE*, *12*(6), 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0178791
- Fischer, J., Lindenmayer, D. (2007). Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography*, *15*, 265–280. doi:10.1111/j.1466-8238.2006.00287.x
- Freile, J., Solano-Ugalde, A., Brinkhuizen, D., Greenfield, P., Lysinger, M., Nilsson, J., Navarrete, L., Ridgely, R. (2017). Rare Birds in Ecuador: Third Report of the Committee for Ecuadorian Records in Ornithology (Cero). *Revista Ecuatoriana de Ornitología*, *0*(1), 8–27. doi: 10.18272/reo.v0i1.446
- Gangoso, L., Gutiérrez-López, R., Martínez de la Puente, J., Figuerola, J. (2019). Louse flies of Eleonora's falcons that also feed on their prey are evolutionary dead-end hosts for blood parasites. *Molecular Ecology*, *28*(7), 1812–1825. doi: 10.1111/mec.15020
- García-Huidobro, M., Varas, O., George-Nascimento, M., Pulgar, J., Aldana, M., Lardies, M., Lagos, N. (2019). Role of temperature and carbonate system variability on a host-parasite



- system: Implications for the gigantism hypothesis. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7–15. doi: 10.1016/j.ijppaw.2019.03.016
- Garcia-Longoria, L., Marzal, A., De Lope, F., Garamszegi, L. (2019). Host-parasite interaction explains variation in the prevalence of avian haemosporidians at the community level. *PLoS ONE*, 14(3), 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0205624
- Genc, A., Eroglu, F., Koltas, I. (2010). Detection of *Plasmodium vivax* by nested pcr and real-time PCR. *Korean Journal of Parasitology*, 48(2), 99–103. doi: 10.3347/kjp.2010.48.2.99
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Arajuno (2014). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Arajuno. Obtenido de [https://www.arajuno.gob.ec/arajuno/images/2017/Plan\\_de\\_Desarrollo/PLAN%20DE%20DESARROLLO%20ARAJUNO.pdf](https://www.arajuno.gob.ec/arajuno/images/2017/Plan_de_Desarrollo/PLAN%20DE%20DESARROLLO%20ARAJUNO.pdf)
- Gulland, F. (1995). Impact of Infectious Diseases on Wild Animal Populations: a Review. *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations*, 20–51. doi: 10.1017/cbo9780511629396.002
- Harrigan, R., Sedano, R., Chasar, A., Chaves, J., Nguyen, J., Whitaker, A., Smith, T. (2014). New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern andes. *Evolutionary Applications*, 7(7), 799–811. doi: 10.1111/eva.12176
- Harvell, C., Mitchell, C., Ward, J., Altizer, S., Dobson, A., Ostfeld, R., Samuel, M. (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296(5576), 2158–2162. doi: 10.1126/science.1063699
- Hellgren, O., Pérez-Tris, J., Bensch, S. (2009). A jack-of-all-trades and still a master of some

- prevalence and host range in avian malaria and relat. *Ecology*, *90*(10), 2840–2849. doi: 10.1890/08-1059.1
- Hellgren, O., Waldenström, J., Bensch, S. (2004). a New Pcr Assay for Simultaneous Studies of Leucocytozoon, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* From Avian Blood. *Journal of Parasitology*, *90*(4), 797–802. doi: 10.1645/ge-184r1
- Hernández-Lara, C., González-García, F., Santiago-Alarcon, D. (2017). Spatial and seasonal variation of avian malaria infections in five different land use types within a Neotropical montane forest matrix. *Landscape and Urban Planning*, *157*, 151–160. doi: 10.1016/j.landurbplan.2016.05.025
- Jones, M., Cheviron, Z., Carling, M. (2013). Spatial patterns of avian malaria prevalence in *Zonotrichia capensis* on the western slope of the peruvian andes. *Journal of Parasitology*, *99*(5), 903–905. doi: 10.1645/12-147.1
- Kamiya, T., O’Dwyer, K., Nakagawa, S., Poulin, R. (2014). Host diversity drives parasite diversity: Meta-analytical insights into patterns and causal mechanisms. *Ecography*, *37*(7), 689–697. doi: 10.1111/j.1600-0587.2013.00571.x
- Lachish, S., Knowles, S., Alves, R., Wood, M., Sheldon, B. (2011). Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: The importance of ecological structure. *Journal of Animal Ecology*, *80*(6), 1196–1206. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01836.x
- Lacorte, G., Flix, G., Pinheiro, R., Chaves, A., Almeida-Neto, G., Neves, F., Leite, L., Santos, F., Braga, E. (2013). Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites - A Molecular Survey from Southeast Brazil. *PLoS ONE*, *8*(3): e57770. doi:

10.1371/journal.pone.0057770

- Laurance, S., Jones, D., Westcott, D., Mckeown, A., Harrington, G., Hilbert, D. (2013). Habitat Fragmentation and Ecological Traits Influence the Prevalence of Avian Blood Parasites in a Tropical Rainforest Landscape. *PLoS ONE*, 8(10), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0076227
- Levin, I., Zwiars, P., Deem, S., Geest, E., Higashiguchi, J., Iezhova, T., Jiménez-Uzcátegui, G., Kim, D., Morton, J., Perlut, N., Renfrew, R., Sari, E., Valkiunas, G., Parker, P. (2013). Multiple Lineages of Avian Malaria Parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos Islands and Evidence for Arrival via Migratory Birds. *Conservation Biology*, 27(6), 1366–1377. doi: 10.1111/cobi.12127
- Levin, I., Parker, P. (2012). In Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy. Haemosporidian Parasites: Impacts on Avian Hosts. Missouri, USA: Elsevier Inc. Pág. 356-363. doi: 10.1016/b978-1-4377-1986-4.00047-0
- Mantilla, J., González, A., Lotta, I., Moens, M., Pacheco, M., Escalante, A., Valkiunas, G., Moncada, L., Pérez-Tris, J., Matta, N. (2016). *Haemoproteus erythrogravidus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae): Description and molecular characterization of a widespread blood parasite of birds in South America. *Acta Tropica*, 159, 83–94. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.02.025
- Markesteijn, L. (2015). Efectos de las perturbaciones antropogénicas sobre la regeneración de los bosques. Obtenido de [http://elti.fesprojects.net/2015\\_AguaSalud/Charla4.pdf](http://elti.fesprojects.net/2015_AguaSalud/Charla4.pdf)
- Marzal, A. (2005). *Senescencia, parasitismo, inmunidad y éxito reproductor en el Avión Común (Delichon urbica Linneo 1758)*. 128.

- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J., De Lope, F. (2008). Effects of malaria double infection in birds: One plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(4), 979–987. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01545.x
- Marzal, A., Ricklefs, R., Valkiunas, G., Albayrak, T., Arriero, E., Bonneaud, C., Czirják, G., Ewen, J., Hellgren, O., Hořáková, D., Iezhova, T., Jensen, H., Križanauskiene, A., Lima, M., De Lope, F., Magnussen, E., Martin, L., Møller, Anders P., Palinauskas, V., Pap, P., Pérez-Tris, J., Sehgal, R., Soler, M., Szölloši, E., Westerdahl, H., Zetindjiev, P., Bensch, S. (2011). Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS ONE*, 6(7). doi: 10.1371/journal.pone.0021905
- Mena, K. (2018). Determinación de Hemoparásitos en aves silvestres de las familias Trochilidae, Tyrannidae, Furnariidae, Columbidae, en las provincias de Zamora Chinchipe y Pastaza.
- Merino, S., Moreno, J., Sanz, J., Arriero, E. (2000). Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1461), 2507–2510. doi: 10.1098/rspb.2000.1312
- Moens, M., Pérez-Tris, J. (2015). Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. *International Journal for Parasitology*, 46(1), 41–49. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.08.001
- Moens, M., Valkiūnas, G., Paca, A., Bonaccorso, E., Aguirre, N., Pérez-Tris, J. (2016). Parasite specialization in a unique habitat: hummingbirds as reservoirs of generalist blood parasites of Andean birds. *The Journal of Animal Ecology*, 85(5), 1234–1245. doi: 10.1111/1365-2656.12550

- Montoro, S. (2015). Detección de hemoparásitos en sangre de aves.
- Munro, H., Martin, P., Moore, I., Bonier, F. (2009). Blood Parasites in Adult and Nestling Birds in the Ecuadorian Andes. *Ornitología Neotropical*, 20, 461–465.
- Navas, A., Cobas, G., Talavera, M., Ayala, J., Lopez, J., Martinez, J. (2007). Experimental validation of Haldane’s hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13728–13731. doi: 10.1073/pnas.0704497104
- Ogrzewalska, M., Uezu, A., Jenkins, C., Labruna, M. (2011). Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. *EcoHealth*, 8(3), 320–331. doi: 10.1007/s10393-011-0726-6
- Outlaw, D., Ricklefs, R. (2010). Comparative Gene Evolution in Haemosporidian (Apicomplexa) Parasites of Birds and Mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3), 537–542. doi: 10.1093/molbev/msp283
- Pacheco, M., Matta, N., Valkiūnas, G., Parker, P., Mello, B., Stanley, C., Stanley, C., Lentino, M., Garcia-Amado, M., Cranfield, M., Pond, S., Escalante, A. (2018). Mode and rate of evolution of haemosporidian mitochondrial genomes: Timing the radiation of avian parasites. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 383–403. doi: 10.1093/molbev/msx285
- Paul, R., Coulson, T., Raibaud, A., Brey, P. (2000). Sex Determination and Sex Differentiation in Malaria Parasites. *Science*, 287, 128–131. doi: 10.1111/j.1469-185x.1988.tb00722.x
- Payevsky, V. (2014). Phylogeny and classification of passerine birds, passeriformes. *Biology Bulletin Reviews*, 4(2), 143–156. doi: 10.1134/S2079086414020054

- Pérez-Rodríguez, A., Khimoun, A., Ollivier, A., Eraud, C., Faivre, B., Garnier, G. (2018). Habitat fragmentation, not habitat loss, drives the prevalence of blood parasites in a Caribbean passerine. *Ecography*, 4, 1–15. doi: 10.1111/ecog.03189
- Perkins, S. (2014). Malaria's Many Mates: Past, Present, and Future of the Systematics of the Order Haemosporida. *Journal of Parasitology*, 100(1), 11–25. doi: 10.1645/13-362.1
- Perlut, N., Parker, P., Renfrew, R., Jaramillo, M. (2018). Haemosporidian parasite community in migrating bobolinks on the Galapagos Islands. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(2), 204–206. doi: 10.1016/j.ijppaw.2018.05.006
- Poulin, R. (1999). The functional importance of parasites in animal communities: Many roles at many levels? *International Journal for Parasitology*, 29(6), 903–914. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00045-4
- Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. doi: 10.3329/akmmcj.v4i1.13682
- Renner, S., Lüdtko, B., Kaiser, S., Kienle, J., Schaefer, H., Segelbacher, G., Tschapka, M., Santiago-Alarcon, D. (2016). Forests of opportunities and mischief: disentangling the interactions between forests, parasites and immune responses. *International Journal for Parasitology*, 46(9), 571–579. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.04.008
- Richard, F., Sehgal, R., Jones, H., Smith, T. (2002). A Comparative Analysis of PCR-Based Detection Methods for Avian Malaria. *The Journal of Parasitology*, 88(4), 819–822. doi: 10.2307/3285374

- Ricklefs, R., Medeiros, M., Ellis, V., Svensson-Coelho, M., Blake, J., Loiselle, B., Soares, L., Fecchio, A., Outlaw, D., Marra, P., Latta, S., Valkiūnas, G., Hellgren, O., Bensch, S. (2017). Avian migration and the distribution of malaria parasites in New World passerine birds. *Journal of Biogeography*, 44(5), 1113–1123. doi: 10.1111/jbi.12928
- Rivero, A., Gandon, S. (2018). Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. *Trends in Parasitology*, 34(8), 712–726. doi: 10.1016/j.pt.2018.06.002
- Roche, B., Guégan, J. (2011). Ecosystem dynamics, biological diversity and emerging infectious diseases. *Comptes Rendus - Biologies*, 334(5–6), 385–392. doi: 10.1016/j.crvi.2011.02.008
- Rogan, J., Lacher, T. (2018). Impacts of Habitat Loss and Fragmentation on Terrestrial Biodiversity. Texas, United State: Elsevier Inc. Pág. 2. doi: 10.1016/b978-0-12-409548-9.10913-3
- Schrag, S., Wiener, P. (1995). Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends in Ecology & Evolution*, 10(8), 319–324. doi: 10.1016/S0169-5347(00)89118-1
- Schrenzel, M., Maalouf, G., Keener, L., Gaffney, P. (2003). Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. *Journal of Parasitology*, 89(5), 1025–1033. doi: 10.1645/GE-3163
- Sehgal, R. (2015). Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 421–430. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.09.001
- Sierra, R., Campos, F., Chamberlin, J. (2002). Assessing biodiversity conservation priorities:

Ecosystem risk and representativeness in continental Ecuador. *Landscape and Urban Planning*, 59(2), 95–110. doi: 10.1016/S0169-2046(02)00006-3

Smith, M., Ramey, A. (2015). Prevalence and genetic diversity of haematozoa in South American waterfowl and evidence for intercontinental redistribution of parasites by migratory birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 22–28. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.12.007

Svensson-Coelho, M., Blake, J., Loiselle, B., Penrose, A., Parker, P., Ricklefs, R. (2013). Diversity, Prevalence, and Host Specificity of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a Western Amazon Assemblage. *Ornithological Monographs*, 76(1), 1–47. doi: 10.1525/om.2013.76.1.1

Valkiūnas, G. (2005). Avian Malaria parasites and other Haemosporidia. doi: 10.15713/ins.mmj.3

Valkiūnas, G., Bensch, S., Iezhova, T., Krizanauskienė, A., Hellgren, O., Bolshakov, C. (2006). Nested Cytochrome B Polymerase Chain Reaction Diagnostics Underestimate Mixed Infections of Avian Blood Haemosporidian Parasites: Microscopy is Still Essential. *Journal of Parasitology*, 92(2), 418–422. doi: 10.1645/ge-610r.1

Valkiūnas, G., Iezhova, T. (2017). Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. *Malaria Journal*, 16(1), 1–24. doi: 10.1186/s12936-017-1746-7

Valkiūnas, G., Iezhova, T. (2018). Keys to the avian malaria parasites. *Malaria Journal*, 17(1), 212. doi: 10.1186/s12936-018-2359-5

Valkiūnas, G., Ilgunas, M., Bukauskaite, D., Fragner, K., Weissenböck, H., Atkinson, C., Iezhova, T. (2018). Characterization of *Plasmodium relictum*, a cosmopolitan agent of avian



malaria. *Malaria Journal*, 17(1), 1–21. doi: 10.1186/s12936-018-2325-2

Valkiūnas, G., Pendl, H., Olias, P. (2017). New *Haemoproteus* parasite of parrots, with remarks on the virulence of haemoproteids in naive avian hosts. *Acta Tropica*, 176, 256–262. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.08.004

Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S., Rivero, A. (2012). *Plasmodium* infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1744), 4033–4041. doi: 10.1098/rspb.2012.1394

Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Östman, Ö. (2004). A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *The Journal of Parasitology*, 90(1), 191–194. doi: 10.1645/GE-3221RN

Warner, R. (1968). The Role of Introduced Diseases in the Extinction of the Endemic Hawaiian Avifauna. *The Condor*, 70(2), 101–120. doi: 10.2307/1365954

Waters, A., Mccutchan, T. (1989). RAPID, SENSITIVE DIAGNOSIS OF MALARIA BASED ON RIBOSOMAL RNA. *The Lancet*, 333(8651), 1343–1346. doi: 10.1016/s0140-6736(89)92800-6

West, S., Smith, T., Nee, S., Read, A. (2002). Fertility Insurance and the Sex Ratios of Malaria and Related Hemospororin Blood Parasites. *The Journal of Parasitology*, 88(2), 258–263. doi: 10.2307/3285571

Woodworth, B., Atkinson, C., LaPointe, D., Hart, P., Spiegel, C., Tweed, E., Henneman, C., LeBrun, J., Denette, T., DeMots, R., Kozar, K., Triglia, D., Lease, D., Gregor, A., Smith, T., Duffy, D. (2005). Host population persistence in the face of introduced vector-borne

diseases: Hawaii amakihi and avian malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(5), 1531–1536. doi: 10.1073/pnas.0409454102

Zehtindjiev, P., Križanauskienė, A., Bensch, S., Palinauskas, V., Asghar, M., Dimitrov, D., Scebba, S., Valkiūnas, G. (2012). A New Morphologically Distinct Avian Malaria Parasite That Fails Detection By Established Polymerase Chain Reaction–Based Protocols for Amplification of the Cytochrome B Gene. *Journal of Parasitology*, 98(3), 657–665. doi: 10.1645/GE-3006.1