

Identificación con métodos de Biología Molecular de Hemoparásitos causantes de Malaria Aviar en Colibríes (Familia: Trochilidae) del Departamento de Santander, Colombia

Angie Nurien Duarte Moreno

Trabajo de Grado para optar por el título de Bióloga

Director

Fernando Rondón González

PhD. Ciencias-Biología

Tutora

Daniela Villamizar Escalante

BsC. Biología

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Ciencias Básicas

Escuela De Biología

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A mis padres y abuelos maternos.

Agradecimientos

Al Proyecto VIE-UIS 2418 por el apoyo otorgado para la presentación de los resultados parciales de este trabajo en el III Simposio del Conocimiento de la Biodiversidad de Parásitos en vida Silvestre en el marco del V Congreso Colombiano de Zoología.

A mis nonitos Pablo y Leo, por su constante apoyo y motivación en el transcurso de mi carrera profesional. A mi mami Olga por siempre creer en mi al apoyar las decisiones que han marcado el rumbo de mi vida y mi proyecto personal. A mi papi Edgar por enseñarme que hay mucho por aprender cada día y la importancia de la curiosidad.

A Fernando Rondón por permitirme trabajar a su lado, por ser mi mentor, por mostrarme lo bonito de la investigación y la importancia de la biología como ciencia. Y a Daniela Villamizar por su amabilidad al guiarme en la realización de este trabajo, por tenerme paciencia al ofrecerme sus conocimientos y apoyo.

A John Sepulveda por brindarme su cariño y apoyo al enseñarme a afrontar con paciencia cada obstáculo. A mis amigas Leydy y Silvia, por los bonitos momentos que siempre hemos pasado juntas.

A Daniel, Juan, Silvia y Bianeth por iniciar juntos un camino en la ornitología.

A mis compañeros del laboratorio de Genética y Biotecnología que, a pesar de algunos percances, siempre estuvieron dispuestos a colaborar en cada tarea en la que requería apoyo, por las risas, las confianzas y los buenos tratos. A Carolina, Angelica, los Gustavos, Hans y Yesid por el cariño, la confianza, la motivación y los gratos momentos en campo. A los profesores de la escuela de Biología que aportaron con sus conocimientos a mi crecimiento profesional.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Objetivos	16
1.1. <i>Objetivo General</i>	16
1.2. <i>Objetivos Específicos</i>	16
2. Competencias.....	17
3. Materiales y Metodos.....	18
3.1. <i>Fase de Campo</i>	18
3.1.1. Área de estudio.	18
3.1.2. Muestreo.	20
3.2. <i>Fase de Laboratorio</i>	20
3.2.1. Extracción de ADN.....	20
3.2.2. Amplificación por PCR.....	21
3.2.3. Electroforesis y visualización.	21
3.2.4. Secuenciación.	22
3.2.5. Análisis de secuencias.....	22
4. Resultados.....	22

5.	Discusión	29
5.1.	<i>Muestreo</i>	30
5.2.	<i>Extracción de ADN</i>	31
5.3.	<i>Modificaciones a los protocolos de PCR.....</i>	31
5.4.	<i>Diagnóstico de malaria en colibríes y prevalencia</i>	33
5.5.	<i>Especies de colibríes infectadas y parásitos identificados</i>	36
6.	Conclusiones	38
7.	Recomendaciones	39
	Referencias Bibliográficas.....	40
	Apéndices	47

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Localidades del departamento de Santander donde se recolectaron muestras de colibríes en el presente estudio.....	19
Figura 2. Porcentaje de muestras sanguíneas de colibríes recolectadas por localidad.	23
Figura 3. Productos amplificados por PCR con los cebadores 343F y 496R.	25
Figura 4. Comparación entre la prevalencia total de malaria en colibríes y por localidad de estudio.....	26
Figura 5. Especies de colibríes comunes entre parejas de localidades.	27
Figura 6. Producto amplificado por PCR con los cebadores HaemF y HaemR2.....	28
Figura 7. Alineamiento de secuencia del gen Citocromo b de parásitos hemosporidios.....	29

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Número de individuos por especie que presentaron infección por malaria en seis localidades del departamento de Santander.....	24

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Comparativo entre el número de especies de colibríes presentes en el departamento de Santander y las registradas en el presente estudio.	47
Apéndice B. Modificaciones realizadas a la PCR descrita por Fallon et al., (2003) en LGB-UIS.	47
Apéndice C. Modificaciones realizadas a la PCR descrita por Hellgren et al., (2004) en LGB-UIS.	47
Apéndice D. Electroferograma de fragmento del gen Cyt b de <i>Haemoproteus archilochus</i> obtenido con el cebador HaemR2 diseñado por Bensch et al., (2000).	48

Resumen en Español

TÍTULO: IDENTIFICACIÓN CON MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE HEMOPARÁSITOS CAUSANTES DE MALARIA AVIAR EN COLIBRÍES (FAMILIA: TROCHILIDAE) DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER, COLOMBIA*

AUTOR: DUARTE MORENO, Angie Nurien*

PALABRAS CLAVE: COLIBRÍES, MALARIA, HEMOPARÁSITOS, BIOLOGÍA MOLECULAR, TROCHILIDAE, *Haemoproteus*.

DESCRIPCIÓN:

La malaria aviar es una enfermedad infecciosa producida por parásitos hemosporidios, reportada en distintas especies de colibríes, los cuales pueden verse afectados en su desempeño reproductivo y supervivencia. Diversos estudios realizados en el neotrópico que incluyen muestras de colibríes han identificado los hemoparásitos que producen la infección, pese a esto, en el departamento de Santander-Colombia, los estudios sobre malaria en este grupo de organismos son inexistentes. Con el objetivo de realizar un primer acercamiento que permita identificar los agentes causales de malaria en colibríes, se realizaron muestreos que comprendieron periodos de lluvia y sequía en seis (6) localidades del departamento de Santander, cuyo rango altitudinal está comprendido entre 65 y 3417 metros sobre el nivel del mar. Un total de 90 muestras de sangre fueron recolectadas con el propósito de extraer ADN para realizar diagnóstico e identificación por PCR anidada de hemoparásitos causantes de la infección. Se detectó en el 43% de las muestras infección por hemosporidios, presentándose con mayor frecuencia (85%) en las muestras recolectadas en la vereda San Benito del Municipio de Rionegro. *Amazilia tzacatl* fue la especie con mayor frecuencia de infección (29,7%) y *Amazilia castaneiventris*, especie en peligro, presentó la enfermedad. Se identificó el parásito *Haemoproteus archilochus* como causante de la enfermedad en individuos de *A. tzacatl* con una identidad del 100% a partir de un fragmento del gen citocromo b. Se destaca la posibilidad de que los ambientes modificados hacia agroecosistemas intensivos pueden conllevar a altos valores de prevalencia de malaria en colibríes.

*Trabajo de grado modalidad Pasantía de investigación

*Facultad de ciencias, Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón, PhD. Tutora: Daniela Villamizar Escalante, BSc.

Abstract

TITLE: IDENTIFICATION THROUGH MOLECULAR BIOLOGY METHODS OF HEMOPARASITES CAUSING AVIAN MALARIA IN HUMMINGBIRDS (FAMILY: TROCHILIDAE) OF SANTANDER DEPARTMENT, COLOMBIA*.

AUTHOR: DUARTE MORENO, Angie Nurien*

KEYWORDS: HUMMINGBIRDS, MALARIA, HEMOPARASITES, MOLECULAR BIOLOGY, TROCHILIDAE, *Haemoproteus*.

DESCRIPTION:

Avian malaria is an infectious disease caused by haemosporidian parasites reported in different species of hummingbirds, which can be affected in their reproductive performance and survival. Several studies carried out in the Neotropics that include samples of hummingbirds have identified the hemoparasites that produce the infection, despite this, in Santander, the studies on malaria in this group of organisms are non-existent. In a first attempt to identify the causal agents of malaria in hummingbirds, we conducted samplings that included rainy and dry seasons in six (6) localities of Santander, whose altitude range is between 65 and 3417 meters above sea level. We collected a total of 90 blood samples in order to extract DNA, for the diagnosis and identification of hemoparasites causing the infection, by using nested-PCR. Haemosporidia infection was detected in 43% of the samples, occurring with more frequency (85%) in the samples collected in the San Benito locality of the Rionegro Municipality. *Amazilia tzacatl* was the species with the highest frequency of infection (29.7%) and *Amazilia castaneiventris*, an endangered species, exhibited the disease. *Haemoproteus archilochus* parasite was found to cause the disease in individuals of *A. tzacatl* with a 100% identity from a fragment of the cytochrome b gene. It highlights the possibility that environments modified towards intensive agroecosystems may lead to high prevalence values of malaria in hummingbirds.

*Bachelor thesis

* Faculty of basic sciences. Biology school. Director: Fernando Rondón, PhD. Tutor: Daniela Villamizar Escalante, BSc.

Introducción

Los colibríes (Trochilidae) son una familia de aves endémicas de América, compuesta de 338 especies, que se distribuyen desde Alaska hasta Tierra de Fuego (McGuire, Witt, Remsen, Dudley & Altshuler, 2009). En Colombia, existen 165 especies de las cuales 17 son endémicas y 18 presentan algún nivel de amenaza (Ayerbe, 2018). Se encuentran en un amplio rango altitudinal desde 0 a 5.000 metros sobre el nivel del mar (m s. n. m), incluyendo sitios donde la actividad humana ha modificado o sustituido los hábitats naturales. Se alimentan de néctar, y ocasionalmente de pequeños insectos, por lo que proveen servicios ecosistémicos como polinizadores para una gran variedad de plantas nativas (Wethington & Finley, 2008; Matta, et al., 2014).

A pesar de la diversidad e importancia ecológica de los colibríes, poco se sabe de parámetros fundamentales de sus poblaciones tales como, tamaños poblacionales, patrones de movimiento e información básica de salud y enfermedades (Godoy, Tell & Ernes, 2014). Aproximadamente el 15% de especies de colibríes se consideran vulnerables a la extinción, principalmente por aspectos relacionados con la fragmentación y degradación del hábitat (Wethington & Finley, 2008; Anderson et al., 2010). Pese a esto, son escasos los estudios que evalúan los efectos de agentes infecciosos de distintas enfermedades en Trochilidae y, por lo tanto, sus efectos sobre las poblaciones no están bien caracterizados (Godoy et al., 2014).

Se conoce que una de las enfermedades que afectan poblaciones de colibríes es la malaria (Griner, 1983), enfermedad infecciosa producida por algunos parásitos hemosporidios (Cadena, 2015), transmitidos por diferentes vectores, principalmente Dípteros (Lotta, Matta, Torres,

Moreno-de Sandino, & Moncada, 2013; Bazán-Quijada, 2014; Cadena, 2015), los cuales infectan la sangre y órganos de sus hospederos (Pérez-Tris et al., 2015). En colibríes se han reportado los géneros *Haemoproteus* (Valkiūnas et al., 2004), *Leucocytozoon* (Matta et al., 2014) y *Plasmodium* (Marzal, García-Longoria, Cárdenas Callirgos & Sehgal, 2015), cuyas infecciones crónicas han demostrado disminución en el desempeño reproductivo y la supervivencia de los hospederos (Merino, Moreno, Sanz & Arriero, 2000; Martínez-de la Puente et al., 2010; Asghar, Hasselquist & Bensch, 2011).

Para colibríes se han reportado tres especies del género *Haemoproteus*, a saber: *H. archiloclus* (Coatney & West, 1938), *H. trochili* (White, Bennett & Williams, 1979) y *H. witti* (Moens et al., 2016). En cuanto al género *Plasmodium*, se han reportado linajes nuevos en recientes estudios realizados en el neotrópico (Harrigan et al., 2014). Y de *Leucocytozoon* se ha descrito una especie nueva encontrada en colibríes del páramo colombiano, denominada *L. quynzae* (Matta et al., 2014). Lo anterior demuestra que las comunidades de colibríes se encuentran infectadas frecuentemente, y los linajes o especies de parásitos que las afectan representan nuevos reportes en la literatura (Mijares et al., 2012; Harrigan et al., 2014; Marzal et al., 2015; Moens et al., 2016).

Los estudios sobre malaria aviar que involucran muestras de colibríes en Colombia se han enfocado en los departamentos del Meta (Renjifo, Sanmartín, & Zulueta, 1952; Rodríguez & Matta, 2001), Risaralda (González, Lotta, García, Moncada & Matta, 2015), Cundinamarca (Mantilla et al., 2013; Matta et al., 2014) y Magdalena (Gonzalez-Quevedo, Pabón & Rivera-Gutierrez, 2016). Algunos de esos estudios incluyeron técnicas moleculares para la identificación de los parásitos (Mantilla et al., 2013; Matta et al., 2014; González et al., 2015; González-Quevedo et al., 2016), entre estos se destaca el trabajo de Mantilla et al., (2013),

quienes identificaron el parásito *Haemoproteus* en el Ermitaño del Pacífico (*Phaethornis yaruqui*), una especie Casi Endémica (CE) de la vertiente occidental de la Cordillera Occidental de los Andes en Colombia (Chaparro-Herrera, Echeverry-Galvis, Córdoba-Córdoba & Sua-Becerra, 2013).

En el departamento de Santander se conoce un estudio que reporta la presencia de malaria en diversas familias de aves, sin embargo, este no considero la familia Trochilidae (Villamizar-Escalante, 2017, datos sin publicar). Por tanto, se desconoce para las poblaciones de colibríes del departamento el tipo de hemoparásito que ocasiona la enfermedad, aspecto indispensable al momento de estimar la frecuencia de infección y la prevalencia de estos (Richard, Sehgal, Jones & Smith, 2002). Por esta razón el presente trabajo de grado detectó la presencia de malaria aviar en colibríes e identificó los hemoparásitos relacionados con la enfermedad en el departamento de Santander.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Establecer el tipo de hemoparásito involucrado en la infección por malaria a partir del uso de herramienta moleculares en una muestra de colibríes (Familia: Trochilidae) proveniente de distintas localidades del departamento de Santander.

1.2. Objetivos Específicos

- Capturar colibríes en diferentes localidades del departamento de Santander.
- Amplificar por PCR un fragmento del gen mitocondrial Citocromo b de los parásitos causantes de malaria en los colibríes.
- Identificar el tipo de hemoparásito involucrado en la infección por malaria en los colibríes objeto de estudio.

2. Competencias

La pasantía de la estudiante estuvo enfocada en implementar técnicas reproducibles y útiles de biología molecular, que permitan identificar y estudiar parásitos hemosporidios presentes en la familia Trochilidae, en el Laboratorio de Genética y Biotecnología (LGB-UIS), adscrito al Grupo de Investigación en Microbiología y Genética de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

Para lograr lo anterior, la estudiante:

- a. Identificó individuos de las diferentes especies de Trochilidae capturados durante las jornadas de muestreo en las localidades donde se adelantó el estudio.
- b. Tomó muestras de sangre de las aves implicadas en el estudio.
- c. Extrajo ADN a partir de muestras sanguíneas de individuos de las especies consideradas.
- d. Amplificó por PCR segmentos de ADN de los hemoparásitos causantes de malaria en Aves.
- e. Obtuvo secuencias para la identificación de parásitos hemosporidios.
- f. Escribió informes técnicos con suficiencia y rigor científico.

3. Materiales y Metodos

3.1. Fase de Campo

3.1.1. Área de estudio El área de estudio se localizó sobre la vertiente occidental de la Cordillera Oriental de los Andes, en el departamento de Santander, Colombia. Las muestras se tomaron en seis localidades: 1) Vereda Campo Duro (CD), municipio de Puerto Wilches (65 m s. n. m.); 2) Vereda San Benito (SB), municipio de Rionegro (902 m s. n. m.); 3) Campus Central de la Universidad Industrial de Santander (UIS), municipio de Bucaramanga (959 m s. n. m.); 4) Hacienda el Roble (HR), entre el municipio de Los Santos y el municipio de Piedecuesta (1650 m s. n. m.); 5) Vereda La Esparta (VE), municipio de Santa Barbara (1900 m s. n. m.); 6) Vereda La Laguna (LL), municipio de Vetas (3417 m s. n. m.) (Figura 1).

Las localidades 1, 2, 4 y 5 se caracterizan por la presencia de sistemas agroforestales como cultivos: Palma de aceite (*Elaeis guineensis*.) en 1, Cítricos (*Citrus* spp.) en 2, Café (*Coffea arabica*) en 4, y Mora (*Rubus* spp.) en 5, y cuentan también con relictos de bosque secundario intervenido. La localidad 3 se destaca como un área urbana con gran intervención humana y la localidad 6 es un ecosistema de alta montaña caracterizado por fragmentos de bosque alto andino y de Páramo (Medina, Macana & Sánchez, 2015).

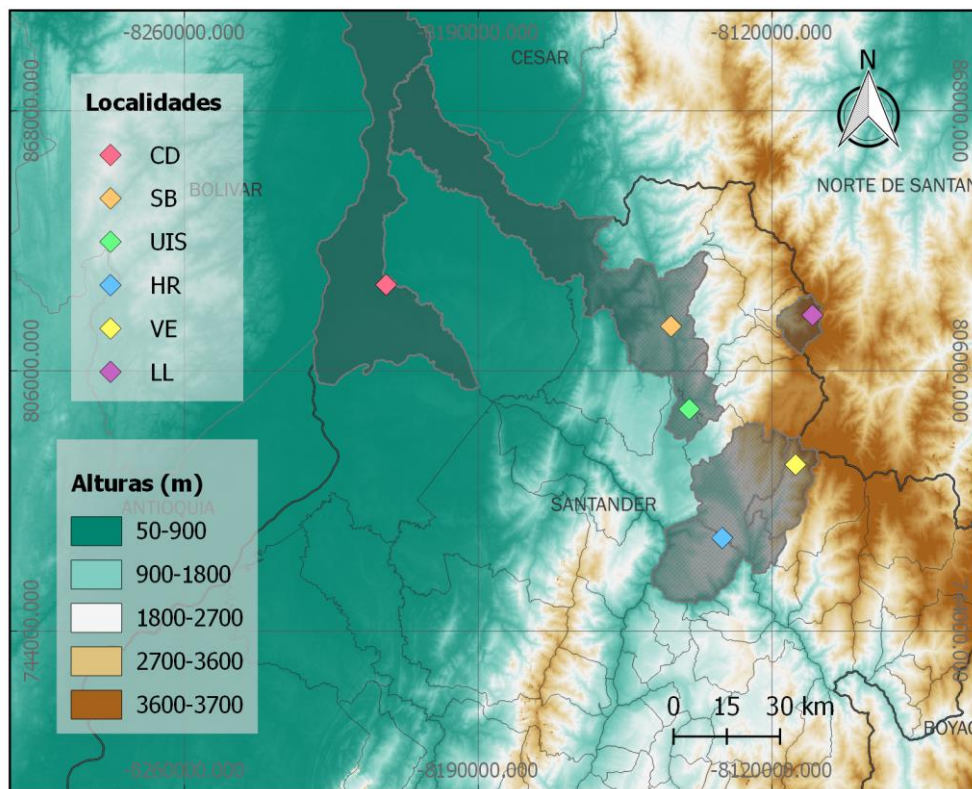


Figura 1. Localidades del departamento de Santander donde se recolectaron muestras de colibríes en el presente estudio. Nota: Los polígonos de color gris corresponden a los municipios de estudio. CD: Vereda Campo Duro, municipio de Puerto Wilches (65msnm); SB: Vereda San Benito, municipio de Rionegro (902msnm); UIS: Campus Central de la Universidad Industrial de Santander, municipio de Bucaramanga (959msnm); HR: Hacienda El Roble, entre el municipio de Los Santos y el municipio de Piedecuesta (1.650msnm); VE: Vereda La Esparta, municipio de Santa Barbara (1.900msnm); LL: Vereda La Laguna, municipio de Vetas (3.417msnm).

3.1.2. Muestreo El esfuerzo de muestreo para cada localidad se estimó siguiendo lo propuesto por Villareal et al., (2004), e involucró periodos de lluvia y sequía entre 2017 y 2018. Las redes de niebla fueron ubicadas a lo largo del ecotono de los cultivos y los remanentes de bosque; las aves capturadas se identificaron hasta especie usando guías de campo (Hilty & Brown, 1986; Restall, Rodner & Lentino, 2007; McMullan & Donegan, 2014) y se determinaron especies endémicas de acuerdo con Chaparro-Herrera et al., (2013). A cada colibrí capturado se le tomó 50µl de sangre a partir de la vena yugular con jeringas de punta fina de 1mL. La sangre se almacenó en tubos Eppendorff de 1,5mL con 50µl de Etanol absoluto, que fueron etiquetados con las dos iniciales del epíteto genérico, las dos iniciales del epíteto específico y el número de captura del individuo y se mantuvieron en frío hasta su procesamiento en el Laboratorio de Genética y Biotecnología de la Universidad Industrial de Santander (LGB-UIS). Finalmente, las aves muestreadas se marcaron antes de su liberación para evitar replicas (Ralph et al., 1996).

3.2. Fase de Laboratorio

3.2.1. Extracción de ADN La extracción de ADN de las muestras de sangre se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico descrito por Green & Sambrook (2012) con modificaciones propias de LGB-UIS consistentes en realizar dos pasos de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1).

3.2.2. Amplificación por PCR Para diagnosticar la infección por malaria aviar en las muestras de colibríes, se realizó una PCR con los cebadores 343F y 496R, que al amplificar un fragmento de 196 pares de bases (pb) indicó un resultado positivo, es decir, la presencia de *Plasmodium* y/o *Haemoproteus* (Fallon, Ricklefs, Swanson & Bermingham, 2003).

Posteriormente, se realizó una PCR anidada usando las muestras cuyo diagnóstico de infección fue positivo, la cual usa los cebadores HaemNFI y HaemNR3 para la primera reacción y con los cebadores HaemF y HaemR2 (Bensch et al., 2000) para la segunda reacción, que amplifican un fragmento de 493pb del gen citocromo b (Cyt b) de los parásitos, lo que permite la identificación y diferenciación entre los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*, con modificaciones en el protocolo descrito por Hellgren, Waldenström & Bensch (2004). En todas las reacciones se usó un control positivo y negativo para verificar que cada producto de PCR no se viera afectado por contaminantes.

3.2.3. Electroforesis y visualización Tanto los productos de la PCR, así como los de la PCR anidada, se visualizaron en geles de poliacrilamida (PAGE) al 6%. Las muestras se cargaron en el gel usando 1µL de DNA Gel Loading Dye 2X (Thermo Scientific™) mezclado con 6µL del producto de PCR, también se usó 1µL de marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific™). La visualización de los geles teñidos con AgNO₃ (Santos, Pena & Epplen, 1993), se realizó con el foto-documentador MicroDOC Basic System (Clever Scientific).

3.2.4. Secuenciación Los productos positivos de la PCR anidada se enviaron al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular-SSiGMoL (Universidad Nacional de Colombia, Bogotá) donde se realizó la purificación y secuenciación bidireccional de cada muestra (Sambrook & Russell, 2001), con el fin de obtener las secuencias necesarias en la identificación de los hemoparásitos.

3.2.5. Análisis de secuencias Las secuencias obtenidas se editaron con el programa CodonCode Aligner v. 8.0.1 (CodonCode Corporation, 2018) en el cual se eliminaron los extremos de cada secuencia que presentaran calidad inferior a 20 basado en el valor de Phred, de esta manera se obtuvo un contig (una región consenso de ADN) de ambas secuencias. La identificación del parásito se realizó comparando las secuencias obtenidas con las publicadas en la base de datos del Banco de Genes (GenBank) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica en USA (National Center for Biotechnology Information, NCBI) y MalAvi (Bensch, Hellgren & Pérez-Tris, 2009) por medio de la herramienta BLAST (Altschul, Gish, Mille, Myers & Lipman, 1990), teniendo en cuenta una identidad mayor al 98%.

4. Resultados

Con los resultados que se describen a continuación, se busca evidenciar el cumplimiento de las competencias asociadas a la pasantía de investigación realizada.

El esfuerzo de muestreo realizado en cada localidad fue de 170 horas-red. En total se recolectaron 90 muestras de sangre de 20 especies de colibríes, de las cuales 28 fueron tomadas en San Benito, 24 en El Roble, 15 en La Esparta, 13 en La Laguna, 6 en La UIS y 4 en Campo

Duro (Figura 2). Las especies de colibríes cuyas muestras fueron recolectadas en este estudio (Tabla 1) equivalen al 33,3% de las especies que Ayerbe (2018) reporta como de posible presencia en el departamento de Santander (Apéndice A).

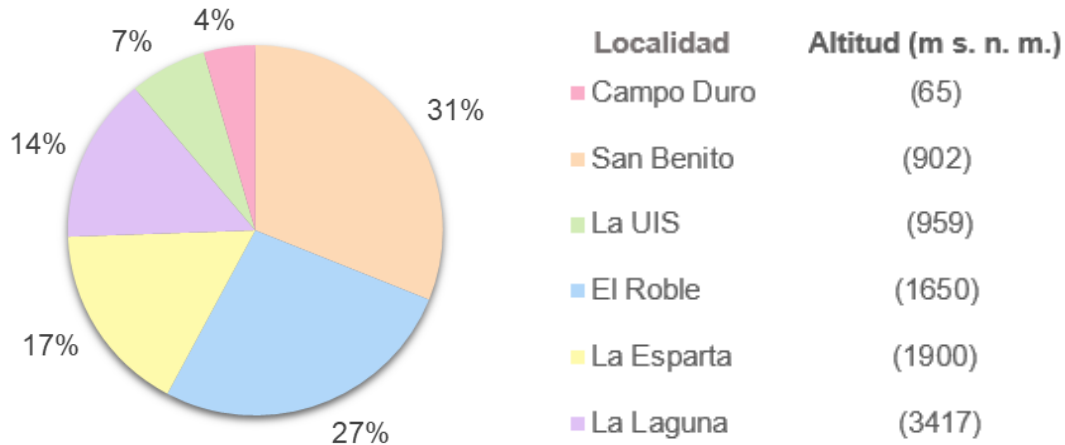


Figura 2. Porcentaje de muestras sanguíneas de colibríes recolectadas por localidad.

De estas especies se destacan: *Phaethornis anthophilus*, de interés para Colombia (Chaparro-Herrera et al., 2013); *Campylopterus falcatus* y *Chalcostigma heteropogon*, especies casi endémicas (Chaparro-Herrera et al., 2013); y *Amazilia cyanifrons* y *Amazilia castaneiventris*, especies endémicas (Chaparro-Herrera et al., 2013; Ayerbe, 2018), de la cual *A. castaneiventris* se encuentra catalogada En Peligro (EN) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2017).

Del total de muestras de sangre recolectadas se obtuvo ADN de 86, cuya concentración se cuantificó entre 30 a 50 ng/μL. Estas muestras se usaron para el diagnóstico por PCR propuesto por Fallon et al., (2003) incluyendo las siguientes modificaciones en reacciones de ampliación a partir de un volumen de 10μL: 1X Taq Buffer suplementado con KCl, 4,6mM MgCl₂, 0,16mM de cada dNTP, 0,2mM de cada cebador y 0,07U de Taq DNA Polimerasa (Thermo Scientific™)

Tabla 1.

Número de individuos por especie que presentaron infección por malaria en seis localidades del departamento de Santander. Nota: n, número de individuos; nI, número de individuos infectados.

Especies	Campo		San		UIS		El Roble		La		La		Total	
	Duro		Benito						Esparta		Laguna			
	n	nI	n	nI	n	nI	n	nI	n	nI	n	nI	n	nI
<i>Amazilia tzacatl</i>	1	0	7	7	4	1	12	3					24	11
<i>Amazilia cyanifrons</i>			3	2			8	0					11	2
<i>Glaucis hirsutus</i>			7	6									7	6
<i>Lesbia victoriae</i>											7	0	7	0
<i>Colibri coruscans</i>									5	3	1	0	6	3
<i>Amazilia castaneiventris</i>					1	1	4	2					5	3
<i>Anthracothorax nigricollis</i>			4	4									4	4
<i>Colibri thalassinus</i>									3	1			3	1
<i>Florisuga mellivora</i>			2	2	1	0							3	2
<i>Phaethornis anthophilus</i>	3	2											3	2
<i>Phaethornis guy</i>			3	1									3	1
<i>Ramphomicron microrhynchum</i>											2	0	2	0
<i>Adelomyia melanogenys</i>									1	0			1	0
<i>Aglaeactis cupripennis</i>											1	0	1	0
<i>Amazilia franciae</i>									1	0			1	0
<i>Boissonneaua flavescens</i>									1	1			1	1
<i>Campylopterus falcatus</i>									1	1			1	1
<i>Chalcostigma heteropogon</i>											1	0	1	0
<i>Coeligena coeligena</i>									1	0			1	0
<i>Coeligena torquata</i>									1	0			1	0
Total	4	2	26	22	6	2	24	5	14	6	12	0	86	37

Adicionalmente, el número de ciclos de PCR se redujo a 30 con respecto a lo descrito por esos autores (Apéndice B). Todo lo anterior permitió obtener el producto amplificado esperado de 196pb, el cual sirve como diagnóstico de la infección ya sea por *Plasmodium* o *Haemoproteus* (Figura 3).

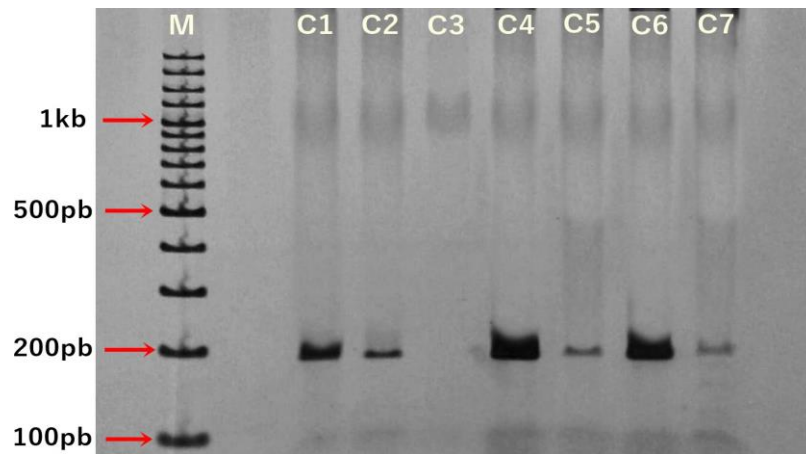


Figura 3. Productos amplificados por PCR con los cebadores 343F y 496R. M: marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Scientific™); C1-C2: control positivo *Plasmodium* sp tipificado en *Catharus ustulatus* (Villamizar-Escalante, 2017); C3: control negativo de PCR; C4-C7: productos amplificados de 193pb indicando infección de malaria en cuatro individuos de *A. tzacatl*.

A partir del producto de PCR obtenido la prevalencia de infección por malaria se detectó en 12 especies de colibríes y se estimó en 43% (37 individuos) (Tabla 1). De estas, *A. tzacatl*, especie común presente en las localidades inferiores a 1900 m s. n. m (Ayerbe, 2018), presentó el mayor número de muestras recolectadas y el mayor número de individuos infectados dentro del estudio (29,7%), seguida de *Glaucis hirsutus* (16,2%). Todos los individuos de *Anthracothorax nigricollis* se encontraron infectados (10,8%), mientras que la infección en las especies endémicas *A. cyanifrons* y *A. castaneiventris* fue del 5,4% y 8,1%, respectivamente. Adicionalmente, al menos un individuo infectado (2,7%) se presentó en las especies *Colibri thalasinus*, *Phaethornis guy*, *Boissonneaua flavescens* y *Campylopterus falcatus* (Tabla 1).

En cuanto a las localidades consideradas la frecuencia de infección se estimó entre 0% en La Laguna hasta 85% en San Benito con 22 individuos de seis especies de colibríes infectados con malaria, lo que corresponde al 59,5% de la prevalencia total. En La Esparta seis individuos de cuatro especies de colibríes presentaron infección por malaria correspondiente al 16,2% de la prevalencia total, mientras que en El Roble se identificaron con malaria cinco individuos (13,5% de la prevalencia total) en dos especies de colibríes. Tanto la UIS como Campo Duro exhibieron cada uno el 5,4% de la prevalencia total a causa de un menor número de individuos y especies con malaria (Figura 4).

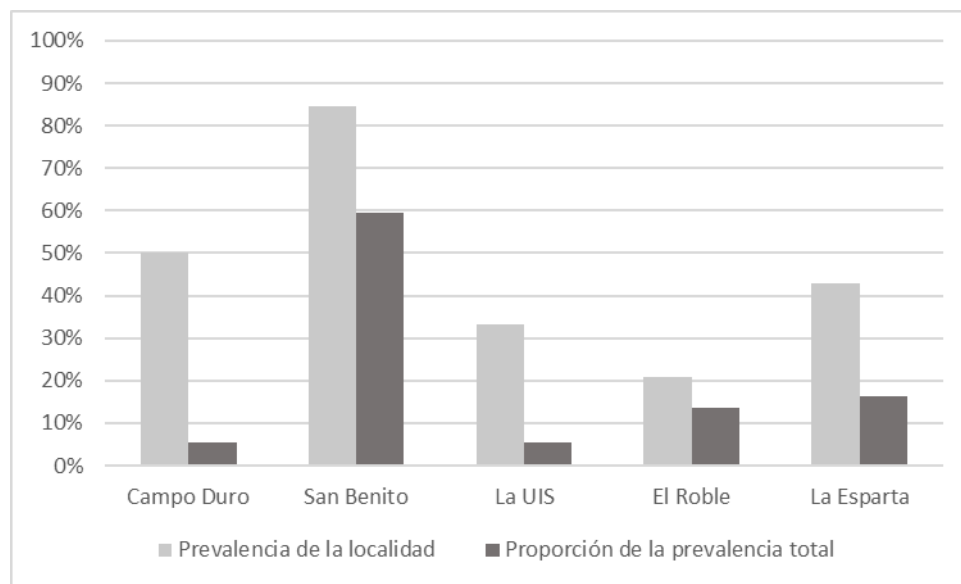


Figura 4. Comparación entre la prevalencia total de malaria en colibríes y por localidad de estudio. Nota: en gris la proporción de muestras de colibríes infectadas de malaria por localidad; en negro la proporción de malaria que aporta cada localidad al total.

Con el objetivo de verificar las especies de aves infectadas con malaria y compartidas entre localidades, se utilizó la herramienta para elaborar diagramas de Venn implementada en el software FunRich v3.1.3 (Pathan et al. 2015). De las 12 especies aquí reportadas con malaria *Florisuga mellivora*, *Colibri coruscans* y *A. cyanifrons* presentaron la infección en una de las dos

localidades donde fueron muestreadas, mientras que *A. castaneiventris* presentó infección en las dos localidades donde fue muestreada y *A. tzacatl* se encontró con malaria en tres de las cuatro localidades en las que se capturó (Figura 5). De estas especies, *A. tzacatl*, *A. cyanifrons* y *F. mellivora* presentan malaria en San Benito (Tabla 1) y *A. tzacatl* y *A. castaneiventris* se encontraron infectadas en la pareja de localidades UIS y El Roble (Figura 5).

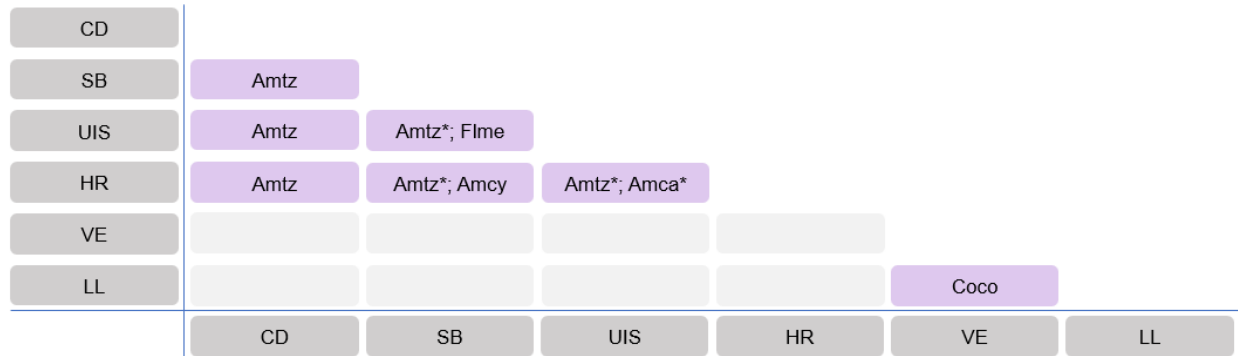


Figura 5. Especies de colibríes comunes entre parejas de localidades. Amtz: *Amazilia tzacatl*; Amcy: *Amazilia cyanifrons*; Amca: *Amazilia castaneiventris*; Flme: *Florisuga mellivora*; Coco: *Colibri coruscans*. Nota: * Especies con malaria en localidades compartidas.

A partir de las muestras positivas diagnosticadas con la prueba de Fallon et al., (2003), se realizó PCR-anidada con el método descrito por Hellgren et al., (2004) con las siguientes modificaciones: para la primera y segunda reacción se adicionó 1X Taq Buffer suplementado con KCl, 3mM de MgCl₂, 0,125mM de cada dNTP, 0,12mM de cada cebador y 0,04U de Taq DNA Polimerasa (Thermo Scientific™) (Apéndice C). Con lo anterior se logró obtener amplificación positiva en dos muestras de *A. tzacatl* procedentes de San Benito (Figura 6).

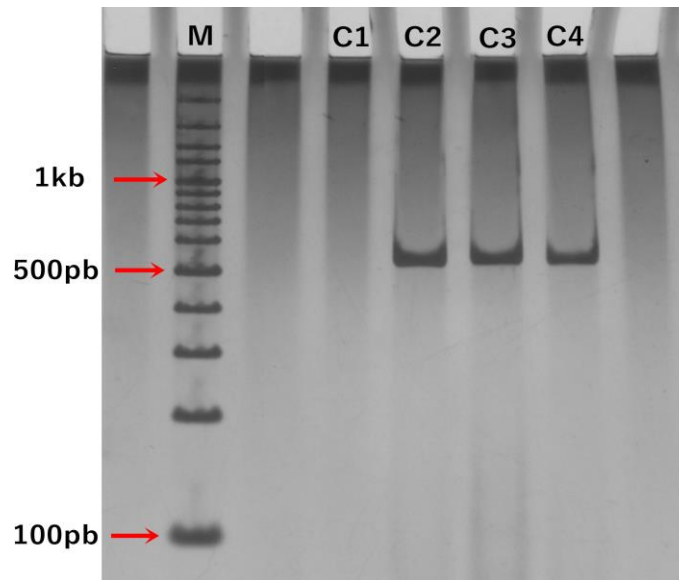


Figura 6. Producto amplificado por PCR con los cebadores HaemF y HaemR2. M: marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Scientific™); C1: control negativo; C2: control positivo *Plasmodium* sp tipificado en *Catharus ustulatus* (Villamizar-Escalante, 2017); C3-C4: fragmento del gen Cyt b en dos individuos de *A. tzacatl*.

De los productos amplificados obtenidos con la PCR anidada se lograron secuencias del gen Cyt b de parásitos hemosporidios de longitud variable entre 420pb y 448pb para cada cebador usado (Apéndice D). Luego de la edición de cada secuencia se formó el contig que resultó con longitud variable entre 478pb y 493pb. La comparación de las secuencias obtenidas con las presentes en las bases de datos del GenBank y MalAvi permitió identificar, con una identidad del 100%, como parásito hemosporidio causal de la infección por malaria en muestras de *A. tzacatl* a *Haemoproteus archilochus* (Figura 7), reportado por Bradshaw et al., (2017) en muestras del colibrí *Archilochus alexandri*.

Range 1: 1 to 478 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
883 bits(478)	0.0	478/478(100%)	0/478(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTACTGGTGCTACATTTGTTTTTATTTTAAACATATTTACATATTTCTAAGAGGTTTAAATT			60
Sbjct 1	CTACTGGTGCTACATTTGTTTTTATTTTAAACATATTTACATATTTCTAAGAGGTTTAAATT			60
Query 61	ATTCATATTCATATTTACCTCTATCATGGATATCTGGACTAGTCATATTTTAAATTTCTA			120
Sbjct 61	ATTCATATTCATATTTACCTCTATCATGGATATCTGGACTAGTCATATTTTAAATTTCTA			120
Query 121	TAGTTACTGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAA			180
Sbjct 121	TAGTTACTGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAA			180
Query 181	CTGTTATAACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTCGTTTCATGGATTTGTGGTGGAT			240
Sbjct 181	CTGTTATAACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTCGTTTCATGGATTTGTGGTGGAT			240
Query 241	ATACAATTAGTGATCCAACCTTAAAAAGATTCTTTGTATTACATTTTCATATTTCCATTTA			300
Sbjct 241	ATACAATTAGTGATCCAACCTTAAAAAGATTCTTTGTATTACATTTTCATATTTCCATTTA			300
Query 301	TAGCTTTATGTATTGTATTATACACATATTTCTTCTTACATTTACAAGGTAGTTCAAATC			360
Sbjct 301	TAGCTTTATGTATTGTATTATACACATATTTCTTCTTACATTTACAAGGTAGTTCAAATC			360
Query 361	CTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCTTCTATCCAAGTCTATTATATCTAGATA			420
Sbjct 361	CTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCTTCTATCCAAGTCTATTATATCTAGATA			420
Query 421	TTAAAGGATTTAATAACGTATTAGTGTATTTTTAGCACAAAGTTTATTTGGTATTTT			478
Sbjct 421	TTAAAGGATTTAATAACGTATTAGTGTATTTTTAGCACAAAGTTTATTTGGTATTTT			478

Figura. 7. Alineamiento de secuencia del gen Citocromo b de parásitos hemosporidios. Query: secuencia de 478pb obtenida en el presente estudio. Sbjct: secuencia de *Haemoproteus archiloachus* reportada por Bradshaw et al., (2017) en el GenBank como KY560447.1.

5. Discusión

Este estudio constituye el primer acercamiento a la caracterización de parásitos causantes de malaria en colibríes implementando en el LGB-UIS técnicas moleculares basadas en PCR para diagnosticar y estimar la prevalencia de la enfermedad, a partir de muestras provenientes de seis localidades del departamento de Santander cuyo rango altitudinal va desde 65 m s. n. m. hasta 3417 m s. n. m. A su vez, los resultados brindan información que permite entender aspectos de la infección en zonas de las cuales no se tienen reportes tanto de las especies hospederas como de los parásitos.

5.1. Muestreo

La presencia de especies de aves se ve afectada negativamente por la modificación y pérdida progresiva del hábitat a causa de actividades antropogénicas (Orbe-Vásquez, Quispe-Zumaeta, Pezo-Díaz & Acosta-Díaz, 2016). Lo anterior se pudo corroborar con el hecho que dos localidades presentaron un menor número de muestras recolectadas, pese a tener esfuerzo similar de muestreo. Las referidas localidades son: a) Campo Duro (4% del total de muestras, Figura 2), localidad que hace parte de la Ciénaga de Paredes un ecosistema intervenido de forma negativa por la tala indiscriminada de bosques para el cultivo extensivo de palma de aceite (*Elaeis guineensis*), la cría de Búfalos y la pesca con artes poco convencionales (Cabildo Verde de Sabana de Torres, 2014), y b) UIS (7% del total de muestras, Figura 2), cuyo campus central se encuentra en un ambiente urbano altamente perturbado con edificaciones que implican la presencia cotidiana de personas y la pérdida paulatina de la cobertura vegetal (Moreno, 2017). Esto refleja el impacto en la presencia de especies cuando las localidades seleccionadas varían en el uso de suelo hacia diferentes niveles de intervención.

Las especies de colibríes capturadas se identificaron teniendo en cuentas sus características morfométricas, de plumaje y distribución, según las guías de campo relacionadas en el apartado materiales y métodos, por tanto, en cada localidad se consideró la altitud, ubicación geográfica y hábitats para determinar la especie de colibrí correspondiente. El muestreo como resultado, concuerda con la distribución y altitud reportada por la guía de avifauna colombiana más reciente dentro de los límites políticos del departamento de Santander (Apéndice A). Lo anterior, constituye soporte que las especies de colibríes muestreadas en este estudio corresponden, a especies que se puede encontrar en este departamento.

5.2. Extracción de ADN

La posibilidad de realizar una extracción de ADN óptima se puede relacionar con la recolecta de las muestras de sangre. Valkiūnas et al., (2008) denotaron que la cantidad de sangre recolectada estuvo limitada por el tamaño de los especímenes, lo que provocó la imposibilidad de tomar muestras óptimas para la posterior extracción de ADN. Si a lo anterior se le suma el hecho de los ajustes requeridos para optimizar el protocolo de extracción de material genético, se puede justificar que haya pérdida de algunas muestras cuyo ADN no queda libre de agentes que pueden alterar su pureza (Freed & Cann, 2006).

5.3. Modificaciones a los protocolos de PCR

Para garantizar y optimizar la PCR diagnóstica en el LGB-UIS, fue necesario variar las concentraciones de algunos reactivos respecto a lo descrito por Fallon et al., (2003), usando escalas de concentración y visualizando los productos de PCR en geles para determinar productos confiables y deseables (C2, C5 y C7, Figura 3).

En el desarrollo de este trabajo de grado modalidad pasantía de investigación se determinó que al incrementar a 4,6mM la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) se lograban productos amplificados definidos. Este resultado es concordante con la idea que cuando el $MgCl_2$ es insuficiente resulta en un menor rendimiento del producto de PCR deseado (Aoyagi, 2001). Así mismo, los cebadores en concentraciones inadecuadas suelen afectar la efectividad de la reacción y como consecuencia puede resultar en la ausencia de producto amplificado (Bartlett & Stirling, 2003), por tanto y al objeto de evitar lo anterior, se determinó como concentración apropiada de los cebadores 0,2mM. Por su parte, la concentración de los deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) puede afectar el rendimiento, especificidad y fidelidad de la

amplificación, esta se modifica en relación con la concentración de MgCl₂ (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990), de esta manera, se redujo a 0,16mM (Apéndice B). La concentración de Taq DNA polimerasa fue de 0,07U, ésta se redujo respecto al protocolo base debido a que la adición excesiva de esta enzima incrementa la posibilidad de aparición de productos inespecíficos (Bartlett & Stirling, 2003).

El número óptimo de ciclos depende, entre otras cosas, de la cantidad de ADN polimerasa incluida en la reacción (Bartlett & Stirling, 2003), en este sentido la Taq usada en el presente (Taq DNA Polymerase, recombinant, Thermo Scientific™, 40 min a 95°C) difiere de la utilizada en el protocolo base (Taq DNA Polymerase, Qiagen 60 min a 94°C) en la termoestabilidad y dado el hecho que al reducir su concentración, esto incide en la reducción del número de ciclos (Aoyagi, 2001).

La identificación de los parásitos hemosporidios se puede realizar tanto con métodos de microscopia (González et al., 2014; Marzal et al., 2015) como moleculares (Harrigan et al., 2014; Gonzalez-Quevedo et al., 2016), e incluso el uso simultaneo de ambas técnicas permiten lograr una identificación más detallada del parásito en cuestión (Bradshaw et al., 2017; Lotta et al., 2015). Los productos de la PCR anidada descrita por Hellgren et al., (2004) son el insumo para obtener secuencias del fragmento del gen citocromo b de parásitos de los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, siendo de gran utilidad en estudios taxonómicos (Bradshaw et al., 2017), genéticos (Mijares et al., 2012), evolutivos (Galen & Witt, 2014) y ecológicos (Pulgarín-R et al., 2018), entre otros, que han permitido entender mejor la relación que existe entre los parásitos y sus hospederos en el neotrópico.

Durante el desarrollo del presente se realizaron algunos cambios respecto a lo descrito en el protocolo reportado por Hellgren et al., (2004) para identificar los parásitos *Haemoproteus* y

Plasmodium. Inicialmente, se presentaban bandas inespecíficas, que se atribuyeron a la concentración de los cebadores, debido a que cuando la concentración usada es alta, contribuye a que se formen dímeros del cebador (Bartlett & Stirling, 2003), por tanto, se redujo cinco veces respecto a la reportada en el protocolo base. La Taq DNA polimerasa y los dNTPs se redujeron cerca de 10 veces la concentración (Apéndice C) dada por Hellgren et al., (2004), lo que permitió mejorar la especificidad de la reacción (Aoyagi, 2001). Finalmente, se estableció la concentración de MgCl₂ a 3mM lo que permitió obtener un producto de PCR óptimo y deseable (Figura 6) para secuenciar (Bartlett & Stirling, 2003), a partir del que se obtuvo secuencias (Apéndice D) de buena calidad que facilitaron la identificación (Figura 7) del parásito implicado en la infección por malaria en algunas muestras de colibríes.

5.4. Diagnóstico de malaria en colibríes y prevalencia

El procedimiento basado en PCR descrito por Fallon et al., (2003) se ha usado ampliamente para detectar la malaria en muestras de sangre de aves (Lacorte et al., 2013; Svensson-Coelho et al., 2013; Moens et al., 2016; Villamizar-Escalante, 2017), con base en dicho procedimiento en este estudio se reporta infección del 43% de las muestras de colibríes analizadas (Tabla 1). Esta prueba se enfoca en amplificar una región del ARN del genoma mitocondrial de los parásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus*, es una región altamente conservada, siendo útil para detectar infecciones de malaria (Fallon et al., 2003), y su uso se justifica al momento de diagnosticar y estimar la prevalencia de esta infección por su especificidad, eficiencia, fiabilidad para detectar infecciones con baja intensidad y reducción del tiempo en que se logran los resultados, el cual es menor respecto a la exploración visual de extendidos de sangre (Fallon & Rickfles, 2008).

Estudios realizados en Colombia en los que se diagnosticó malaria en colibríes, muestran valores de prevalencia inferior al 15% cuando se utilizaron técnicas asociadas a microscopía (Matta et al., 2014; González et al., 2015; Lotta et al., 2016) y superan el 30% cuando se utilizaron métodos asociados a la amplificación por PCR (González-Quevedo et al., 2016). El alto valor de prevalencia reportado en este estudio, comparado con técnicas asociadas a la microscopía e incluso a la PCR, respalda la posibilidad que el uso de técnicas moleculares incrementa el poder de detección de la infección, así como pueden mejorar la estima de la prevalencia (Fallon et al., 2003; Ferraguti et al., 2013; Bell, Weckstein, Fecchio & Tkach, 2015; Villamizar-Escalante, 2017).

La prevalencia es un parámetro poblacional que puede verse afectado por factores ambientales, como la temperatura, la precipitación, la altitud y la proximidad a cuerpos de agua (Garamszegi, 2011), máxime cuando se trata de parásitos transmitidos por vectores ya que estos dependen de las condiciones externas (Carbó-Ramírez, Zuria, Schaefer & Santiago-Alarcon, 2017). En el presente estudio las localidades fueron principalmente agroecosistemas que se diferencian tanto en uso de suelo, hábitat, precipitación y elevación, donde la prevalencia varió entre ellas.

La Laguna presentó prevalencia de 0%, es decir, en esta localidad no se detectó infección en las muestras de individuos evaluados (Tabla 1). Este resultado puede atribuirse al estado del hábitat, debido a que La Laguna se caracteriza por ser un ambiente de paramo y bosque de niebla ubicado a 3417 m s. n. m., los reportes de malaria aviar a causa de *Haemoproteus* y *Plasmodium* han sido registrados hasta los 3300 m s. n. m. (González et al., 2014) por lo que cabe la posibilidad de que los vectores relacionados con estos géneros no se encuentren en elevaciones superiores lo que limitaría la presencia de los parásitos. Pese a lo anterior, no descarta la

posibilidad de que las muestras colectadas puedan estar infectadas por *Leucocytozoon*, un género que no se tuvo en cuenta dentro de este estudio y que se ha reportado en estas zonas en aves de la familia Thraupidae (Villamizar-Escalante, 2017).

La prevalencia en El Roble fue del 21% además de una baja proporción de la prevalencia total (Figura 4), esta localidad se caracteriza por presentar cultivo de café de sombrero con presencia de algunos relictos de bosque natural, pastizales y lagos artificiales, cuyo manejo se basa en prácticas de agricultura orgánica (Peraza, Cifuentes, Alayon & Clavijo, 2004), y al estar los cafetales sembrados en zonas aledañas a arbustos y árboles nativos se mantiene la estructura de la vegetación lo que puede ofrecer un hábitat con buena oferta de alimento, nutrientes y refugio, por tanto, es un agroecosistema que brinda aportes positivos en mantenimiento de la fauna allí presente (García, 2018), que eventualmente puede desfavorecer la presencia de la enfermedad. Adicionalmente, en esta localidad se observaron las especies endémicas de colibríes reportadas en este estudio, destacando la importancia de realizar prácticas en procura de incrementar la presencia de estas especies.

La vegetación presente en el entorno de La Esparta corresponde a bosque Andino constituido por árboles de gran porte donde se destaca la abundancia del roble (*Quercus humboldtii*) (Vargas-Ramírez, Colmenares-Pinzón & Serrano-Cardozo, 2018). En esta localidad predomina el cultivo de bayas como la mora, la cual requiere espacios abiertos y amplios lo que puede redundar en el valor de prevalencia registrado (43%, Figura 4). Otra localidad en la que se verifican modificaciones importantes en la matriz boscosa es San Benito, la cual presentó la mayor prevalencia entre localidades (85%) y la mayor proporción de prevalencia total (Figura 4), resultado que contrasta con lo reportado por Villamizar-Escalante, (2017) quien estimó en esta localidad una frecuencia baja de infección (4,1%) en aves de las familias Thraupidae y Parulidae.

Los agroecosistemas en San Benito principalmente implican cultivos de cítricos (*Citrus* spp) como mandarina, naranja y limón, con pequeños bordes de bosque secundario y pastizales (Villamizar-Escalante, 2017). Estos resultados permiten hipotetizar que posiblemente al incrementar el nivel de intervención hacia agroecosistemas cada vez más intensivos, la prevalencia de infección por malaria también incrementará.

5.5. Especies de colibríes infectadas y parásitos identificados

El presente constituye el primer reporte de infección por parásitos hemosporidios causantes de malaria, diagnosticados con el método propuesto por Fallon et al., (2003) en las especies hospederas *Florisuga mellivora*, *Phaethornis anthophilus*, *Anthracothorax nigricollis*, *Boissonneaua flavescens*, *Campylopterus falcatus*, *Amazilia tzacatl*, *A. cyanifrons* y *A. castaneiventris*. Este resultado debe constituir la base que permita identificar parásitos causales de malaria en distintas especies de colibríes muestreadas en zonas de las que no se tienen reportes, como en el departamento de Santander, y también establecer el posible impacto que estos parásitos puedan llegar a generar en las poblaciones de especies de aves endémicas. Es el caso de *A. castaneiventris*, especie catalogada EN (IUCN, 2017), donde la enfermedad podría ser un factor adicional que contribuya al detrimento de sus poblaciones.

Estudios realizados con diferentes técnicas han reportado infección de malaria en especies de colibríes que se presentan también en este estudio (Tabla 1). White et al., (1979) diagnosticaron como agentes causales de la infección a *Haemoproteus archilochus* y *Haemoproteus trochili* en muestras de *Glaucis hirsutus* y *Phaethornis guy*, respectivamente, a partir del uso de microscopia en extendidos de sangre tomados en Panamá. En su estudio, Harrigan et al., (2014) reportaron doble infección a partir de PCR anidada en muestras tomadas en el Parque Nacional Sangay de

Ecuador a 1403 m s. n. m. de la especie *Phaethornis guy* como hospedera de parásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus*. En *Colibri coruscans* se ha reportado malaria causada por *Plasmodium* en muestras provenientes de la región de Huánuco en Perú a 1894 m s. n. m., combinando el método propuesto por Hellgren et al., (2004) y extendidos de frotis sanguíneos (Marzal et al., 2015). Moens et al., (2016) utilizaron, además de extendidos y PCR anidada, PCR cuantitativa en tiempo real para estimar la parasitemia e identificaron a *Haemoproteus witti* en muestras de la especie *Colibri thalassinus* provenientes del Parque Nacional Podocarpus de Ecuador.

Lo anterior es evidencia importante que algunas de las especies de colibríes infectadas de malaria, fueron muestreadas en áreas protegidas que suponen presentan un grado de conservación importante, lo cual constituye soporte para realizar a futuro estudios en ecosistemas con zonas boscosas muy conservadas en el departamento de Santander, al objeto de comprobar la hipótesis de valores muy bajos de prevalencia relacionados con el estado de conservación de dichos ecosistemas.

De las especies de colibríes infectadas y compartidas en las localidades *A. tzacatl*, siendo una especie común y ecológicamente tolerante (Hilty & Brown, 1986), se encontró infectada en las parejas de localidades UIS-SB, UIS-HR y HR-SB (Figura 5), este resultado puede ser un incentivo para el estudio de la dinámica poblacional de esta especie en términos del flujo genético y la implicación que esto puede tener en la transmisión de malaria, efecto que debe ser corroborado con estudios genéticos poblacionales u otros que incluyan factores como ecología de los vectores y variables ambientales (temperatura, elevación y humedad relativa, (Pulgarín-R et al., 2018)), que contribuyan al entendimiento de la presencia o ausencia de parásitos hemosporidios en las áreas estudiadas.

La identificación de *Haemoproteus archilochus* en muestras de *A. tzacatl*, (Figura 7, Apéndice D) constituye el primer reporte de este parásito en muestras de colibríes de Colombia. *H. archilochus* ha sido reportado únicamente en especies de la familia Trochilidae, fue descrita por Coatney & West (1938) en la especie hospedera *Archilochus colubris* y es de distribución zoogeográfica neártica y neotropical en el rango de distribución de hospedadores vertebrados (Valkiūnas, 2005). Este resultado evidencia que la especie parasita está establecida en el departamento de Santander, lo que supone un interés para comprender su ciclo de transmisión, así como las implicaciones que este conlleva.

Adicionalmente, Valkiūnas (2005) presenta en la tabla 70 una lista, reportada por White et al., (1979), de 12 especies de colibríes hospederos de *H. archilochus* que incluyen a *A. tzacatl*. La revisión realizada al artículo de White et al., (1979) no da indicios de haber descrito la presencia de malaria en dicha especie de colibrí. Este hecho puede constituir una contradicción que genera la perspectiva de ampliar la búsqueda de *H. archilochus* en las especies de colibríes reportadas en la tabla 70 por Valkiūnas (2005).

6. Conclusiones

Después de estandarizar en LGB-UIS el protocolo descrito por Fallon et al., (2003) para el diagnóstico de malaria y el reportado por Hellgren et al., (2004) para la identificación de parásitos transmisores de esta condición en colibríes de algunas localidades del departamento de Santander se concluye que:

Se identificó a *Haemoproteus archilochus* como el parásito causante de malaria en muestras de *Amazilia tzacatl*, especie de Trochilidae cuya frecuencia de infección fue la más alta obtenida en el estudio y se estimó en 29,7%.

La prevalencia de malaria aviar total fue del 43%, valor que sobrepasa lo estimado en otros estudios que involucran muestras de colibríes realizados en el neotrópico, y resalta la importancia de estudiar esta enfermedad infecciosa en las poblaciones silvestres en el departamento de Santander.

7. Recomendaciones

Se recomienda en estudios futuros la inclusión de extendidos a partir de muestras de sangre periférica para la búsqueda de hemosporidios en individuos de la familia Trochilidae. También se recomienda realizar la búsqueda e identificación de hemosporidios del género *Leucocytozoon*, especialmente en muestras de colibríes provenientes de zonas cuyas elevaciones superen 2000 m s. n. m, así como la búsqueda de *H. archilochus*. Por último, se recomienda realizar un estudio que incluya variables ambientales que permitan entender mejor las relaciones vector-parásito-hospedero cuando estos son miembros de Trochilidae.

Referencias Bibliográficas

- Altschul, S. F., Gish, W., Mille, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, D. L., House, P., Hyman, R. E., Steiner, R., Hawkins, H. R., Thorn, S., Marineros, L. E. (2010). Rediscovery of the Honduran Emerald *Amazilia luciae* in western Honduras: insights on the distribution, ecology, and conservation of a ‘Critically Endangered’ hummingbird. *Bird Conservation International*, 20(3), 255-262. doi:10.1017/S0959270910000389
- Aoyagi, K. (2001). PCR. En *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide* (págs. 291-330). Wiley-Liss, Inc.
- Asghar, M., Hasselquist, D., & Bensch, S. (2011). Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? *Journal of Avian Biology*, 42(6), 530-537. doi:10.1111/j.1600-048X.2011.05281.x
- Ayerbe Quiñones, F. (2018). *Guía ilustrada de la Avifauna colombiana*. Bogotá, Colombia: Puntoaparte.
- Bartlett, J., & Stirling, D. (2003). *PCR Protocols*. Humana Press Inc.
- Bazán-Quijada, A. (2014). *Detección de hemoparásitos en sangre de aves*. Tesis de Grado en Biología, Universidad de Jaén, Jaén, España. Obtenido de <http://tauja.ujaen.es/handle/10953.1/558>
- Bell, J., Weckstein, J., Fecchio, A., & Tkach, V. (2015). A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians. *Parasites & Vectors*, 8(383), 1-9. doi:10.1186/s13071-015-0993-0
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., & Torres Pinheiro, R. (2000). Host Specificity in Avian Blood Parasites: A Study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* Mitochondrial DNA Amplified from Birds. *Proceedings: Biological Sciences. Royal Society.*, 267(1452), 1583-1589. doi:10.1098/rspb.2000.1181.
- Bensch, S., Hellgren, O., & Pérez-Tris, 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.
- BirdLife International. (2017). *Amazilia castaneiventris* (amended version of 2016 assessment) The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T22687614A119258197. doi: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T22687614A119258197.en>
- Bradshaw, A., Tell, L., Ernest, H., Bahan, S., Carlson, J., & Sehgal, R. (2017). Detection and prevalence of *Haemoproteus archilochnus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in two species of California hummingbirds. *Parasitology Research*, 116(7), 1879-1885. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5463-5>
- Cabildo Verde de Sabana de Torres (2014). Flora y Fauna asociada al hábitat del Manatí antillano Ciénaga de Paredes, 525 registros, aportados por Rodríguez, E. (Director del Proyecto, Investigador principal), Cáceres, F. (Investigador principal, proveedor de contenidos, proveedor de metadatos), Dueñas A. (Investigador principal), Mojica, B. (Investigador principal), Rivera, J. (Investigador principal)
- Cadena, H. F. (2015). Malaria Aviar en los Chingolos (*Zonotrichia capensis*) del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador. Tesis de Grado en Licenciatura en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/8619>
- Carbó-Ramírez, P., Zuria, I., Schaefer, H., & Santiago-Alarcon, D. (2017). Avian haemosporidians at three environmentally contrasting urban greenspaces. *Journal of Urban Ecology*, 3(1), 1-11. doi:<https://doi.org/10.1093/jue/juw011>
- Chaparro-Herrera, S., Echeverry-Galvis, M., Córdoba-Córdoba, S., & Sua-Becerra, A. (2013). Listado actualizado de las aves endémicas y casi-endémicas de Colombia. *Biota Colombiana*, 14(2), 235-272. doi:<https://doi.org/10.21068/bc.v14i2.289>
- Coatney, G. R., & West, E. (1938). Some Blood Parasites from Nebraska Birds. II. The American Midland Naturalist, 19(3), 601-612. doi:<http://www.jstor.org/stable/2420473>
- Fallon, S. M., Ricklefs, R. E., Swanson, B. L., & Bermingham, E. (2003). Detecting Avian Malaria: An Improved Polymerase Chain Reaction Diagnostic. *Journal of Parasitology*, 89(5), 1044-1047. doi:<https://doi.org/10.1645/GE-3157>
- Fallon, S. M., & Ricklefs, R. E. (2008). Parasitemia in PCR-Detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* Infections in Birds. *Journal of Avian Biology*, 39(5), 514-522. doi:10.1111/j.2008.0908-8857.04308.x.

- Ferraguti, M., Martínez-de la Puente, J., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2013). On the study of the transmission networks of blood parasites from SW Spain: diversity of avian haemosporidians in the biting midge *Culicoides circumscriptus* and wild birds. *Parasites & Vectors*, 6(208), 1-7. doi:10.1186/1756-3305-6-208
- Freed, L. A., & Cann, R. L. (2006). DNA Quality and Accuracy of Avian Malaria PCR Diagnostics: A Review. *The Condor: Ornithological Applications*, 108(2), 459–473. doi:10.1650/0010-5422(2006)108[459:DQAAOA]2.0.CO;2
- Galen, S., & Witt, C. (2014). Diverse avian malaria and other haemosporidian parasites in Andean house wrens: evidence for regional co-diversification by host-switching. *Journal of Avian Biology*, 14, 374-386. doi:10.1111/jav.00375
- Garamszegi, L. (2011). Climate change increases the risk of malaria in birds. *Global Change Biology*, 17, 1751–1759. doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02346.x
- García Barrios, B., & Rondón González, F. (2018). Análisis de la diversidad genética a partir de secuencias del gen ND2 de *Euphonia lanirostris* en tres localidades de Santander, Colombia. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Godoy, L. A., Tell, L. A., & Ernes, H. B. (2014). Hummingbird health: pathogens and disease conditions in the family Trochilidae. *Journal of Ornithology*, 155(1), 1-12. doi:10.1007/s10336-013-0990-z
- González, A. D., Lotta, I. A., García, L. F., Moncada, L. I., & Matta, N. E. (2015). Avian haemosporidians from Neotropical highlands: Evidence from morphological and molecular data. *Parásitology International*, 64(4), 48-59. doi:10.1016/j.parint.2015.01.007
- González, A., Matta, N., Ellis, V., Miller, E., Ricklefs, R., & Gutiérrez, H. (2014). Mixed Species Flock, Nest Height, and Elevation Partially Explain Avian Haemoparasite Prevalence in Colombia. *PLoS ONE*, 9(6), e100695. doi:10.1371/journal.pone.0100695
- Gonzalez-Quevedo, C., Pabón, A., & Rivera-Gutierrez, H. F. (2016). Prevalence of haemosporidians in a Neotropical endemic bird area. *Avian Conservation and Ecology*, 11(1), 7. doi:http://dx.doi.org/10.5751/ACE-00834-110107
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). New York: Springer Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Griner, L. A. (1983). Orden Apodiformes. In L. A. Griner, *Pathology of zoo animals. A review of necropsies conducted over a fourteen-year period at the San Diego Zoo and San Diego Wild Animal Park* (pp. 235-238). San Diego, California, USA.

- Harrigan, R. J., Sedano, R., Chasar, A. C., Chaves, J. A., Nguyen, J. T., Whitaker, A., & Smith, T. B. (2014). New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. *Evolutionary Applications*, 7(7), 799-811. doi:10.1111/eva.12176
- 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:https://doi.org/10.1645/GE-184R1
- Hilty, S. L., & Brown, W. L. (1986). *Guía de las Aves de Colombia*. (A. B. Conservancy, Ed., & H. Álvarez-López, Trans.) Princeton University Press.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., & White, T. (1990). *PCR Protocols: a guide of methods and applications*. Academic Press.
- Lacorte, G., Félix, G., Pinheiro, R., Chaves, A., Almeida-Neto, G., Neves, F., Braga, É. (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
- Lotta, I. A., Matta, N. E., Torres, R. D., Moreno-de Sandino, M., & Moncada, L. I. (2013, April). *Leucocytozoon fringillinarum* and *Leucocytozoon dubreuii* in *Turdus fuscater* from a Colombian Páramo Ecosystem. *Journal of Parasitology*, 99(2), 359-362. doi:10.1645/GE-3156.1
- Mantilla, J. S., Matta, N. E., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., González, A. D., & Moncada, L. I. (2013). Identification of *Plasmodium* (Haemamoeba) *lutzi* (Lucena, 1939) from *Turdus fuscater* (Great Thrush) in Colombia. *Journal of Parasitology*, 99(4), 662-668. doi:https://doi.org/10.1645/12-138.1
- Martínez-de la Puente, J., Merino, S., Tomás, G., Moreno, J., Judith, M., Elisa, L., Belda, E. J. (2010). The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: a medication experiment. *Biology Letters*, 6(5), 663-665. doi:10.1098/rsbl.2010.0046
- Marzal, A., García-Longoria, L., Cárdenas Callirgos, J. M., & Sehgal, R. N. (2015). Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. *Biological Invasions*, 17(1), 39-45. doi:https://doi.org/10.1007/s10530-014-0718-x
- Matta, N. E., Lotta, I. A., Valkiūnas, G., González, A. D., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., Rodríguez-Fandiño, O. A. (2014). Description of *Leucocytozoon quynzae* sp. nov. (Haemosporida, Leucocytozoidae) from hummingbirds, with remarks on distribution and

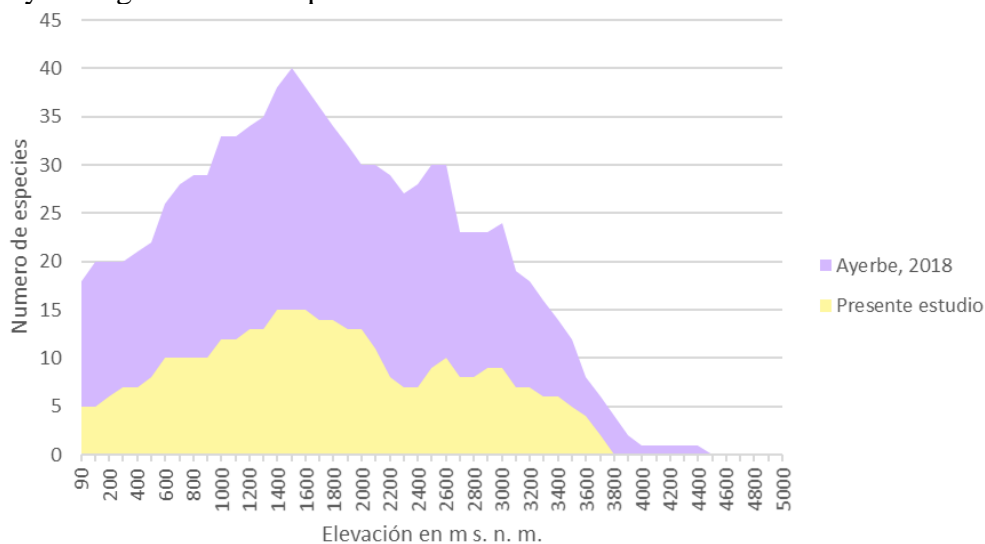
- possible vectors of leucocytozoids in South America. *Parásitology Research*, 113(2), 457-468. doi:10.1007/s00436-013-3675-x
- McGuire, J. A., Witt, C. C., Remsen Jr, J. V., Dudley, R., & Altshuler, D. L. (2009). A higher-level taxonomy for hummingbirds. *Journal of Ornithology*, 150(1), 155-165.
- McMullan, M., & Donegan, T. (2014). *Field Guide to the Birds of Colombia* (2nd ed.). Bogotá, Colombia: Fundación Proaves.
- Medina, W., Macana García, D. C., & Sánchez, F. (2015). Birds and Mammals of High Mountain Ecosystems in the Rabanal Paramo (Boyacá-Colombia). *Ciencia en Desarrollo*, 6(2), 185-198.
- Merino, S., Moreno, J., Sanz, J. J., & Arriero, E. (2000). Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *The Royal Society*, 267(1461), 2507-2510. doi:10.1098/rspb.2000.1312
- Mijares, A., Rosales, R., & Silva-Iturriza, A. (2012). Hemosporidian Parasites in Forest Birds from Venezuela: Genetic Lineage Analyses. *Avian Diseases*, 56(3), 583-588. doi:https://doi.org/10.1637/10058-011312-ResNote.1
- Moens, M. A., Valkiūnas, G., Paca, A., Bonaccorso, E., Aguirre, N., Pérez-Tris, J., & Cotter, S. (2016). Parasite specialization in a unique habitat: hummingbirds as reservoirs of generalist blood parasites of Andean birds. *Journal of Animal Ecology*, 85(5), 1234-1245. doi:10.1111/1365-2656.12596
- Moreno, J. (2017). Aves de la UIS. En *Colores al vuelo*. (Págs.: 163-230). Publicaciones UIS.
- Orbe Vásquez, M., Quispe Zumaeta, L., Pezo Díaz, R., & Acosta Díaz, A. (2016). Diversidad de aves en ambientes urbanos y periurbanos de la ciudad de Iquitos y bosque de varillal, Loreto, Perú. *Conocimiento Amazónico*, 7(1), 3-13.
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C.-S., Gangoda, L., Quek, C., Williamson, N., Mathivanan, S. (2015). FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*, 15, 2597–2601. doi:https://doi.org/10.1002/pmic.201400515
- Peraza, C., Cifuentes, Y., Alayon, Y., & Clavijo, C. (2004). Adiciones a la avifauna de un cafetal con sombrero en la mesa de los santos (Santander, Colombia). *Universitas Scientiarum*, 9(Es1), 19-32. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49909403>

- Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Križanauskienė, A., Waldenström, J., & Bensch, S. (2015). What are malaria parasites? *Trends in Parasitology*, 21(5), 209-211. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.03.001>
- Pulgarín-R PC, Gómez JP, Robinson S, Ricklefs RE, Cadena CD. (2018). Host species, and not environment, predicts variation in blood parasite prevalence, distribution, and diversity along a humidity gradient in northern South America. *Ecol Evol*; 8:3800–3814. <https://doi.org/10.1002/ece3.3785>
- Ralph, C., Geupel, G. R., Pyle, P., Martin, T. E., DeSante, D. F., & Milá, B. (1996). Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-159. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- Renjifo, S., Sanmartín, C., & Zulueta, J. (1952). A survey of the blood parasites of vertebrates in Eastern Colombia. *Acta Tropica*, 9(2), 151-169.
- Restall, R., Rodner, C., & Lentino, M. (2007). Birds of Northern South America. An Identification Guide (Vol. 2: Plates and Maps). Yale University Press.
- Richard, F., Sehgal, R., Jones, H., & Smith, T. (2002). A Comparative Analysis of PCR-Based Detection Methods for Avian Malaria. *Journal of Parasitology*, 88(4), 819-822. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0819:ACAOPB]2.0.CO;2
- Rodríguez, O. A., & Matta, N. E. (2001). Blood Parasites in Some Birds from Eastern Plains of Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(8), 1173-1176. doi:10.1590/S0074-02762001000800026
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, F. R., Pena, S. D., & Epplen, J. T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetics*, 90(6), 655-656. doi:10.1007/BF00202486
- 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, 1-47. doi:10.1525/om.2013.76.1.1
- Valkiunas, G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press.

- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Brooks, D. R., Hanelt, B., Brant, S. V., Sutherlin, M. E., & Causey, D. (2004). Additional Observations on Blood Parasites of Birds in Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3), 555-561. doi:<https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.3.555>
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R. N., & Bensch, S. (2008). A Comparative Analysis of Microscopy and PCR-Based Detection Methods for Blood Parasites. *Journal of Parasitology*, 94(6), 1395-1401. Retrieved from <https://doi.org/10.1645/GE-1570.1>
- Vargas Ramírez, L., Colmenares Pinzón, J., & Serrano Cardozo, V. (2018). Uso de microhabitat por un ensamble de pequeños mamíferos no voladores en un bosque de roble sobre la Cordillera Oriental de los Andes colombianos. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(2), 479-487. doi:10.22201/ib.20078706e.2018.2.1933
- Villamizar-Escalante, D. (2017). Prevalencia y diversidad de hemoparásitos causantes de malaria en comunidades de aves del departamento de Santander, Colombia. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Villareal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., Umaña, A. M. (2004). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Bogotá, Colombia: Programa de inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Wethington, S. M., & Finley, N. (2008). Addressing Hummingbird Conservation Needs: An Initial Assessment. *Proceedings of the Fourth International Partners in Flight Conference: Tundra to Tropics*, 662-666.
- White, E. M., Bennett, G. F., & Williams, N. A. (1979). Avian Haemoproteidae. 11. The haemoproteids of the hummingbird family Trochilidae. *Canadian Journal of Zoology*, 57(4), 908-913. doi:10.1139/z79-111

Apéndices

Apéndice A. Comparativo entre el número de especies de colibríes presentes en el departamento de Santander y las registradas en el presente estudio.



Apéndice B. Modificaciones realizadas a la PCR descrita por Fallon et al., (2003) en LGB-UIS.

Reactivos	Fallon et al., (2003)	Presente estudio
Buffer	No específica	1 X
MgCl ₂	2,0-2,5 mM	4,6 mM
dNTPs	0,2 mM	0,16 mM
343F	0,4 μM	0,2 mM
496R	0,4 μM	0,2 mM
Taq DNA polimerasa	0,5 U	0,07 U
N° de ciclos	35	30

Apéndice C. Modificaciones realizadas a la PCR descrita por Hellgren et al., (2004) en LGB-UIS.

Reactivos	Hellgren et al., (2004)	Presente estudio
Buffer	1 X	1 X
MgCl ₂	1,5 mM	3 mM
dNTPs	1,25 mM	0,125 mM
HaemNFI y HaemF	0,6 mM	0,12 mM
HaemNR3 y HaemR2	0,6 mM	0,12 mM
Taq DNA polimerasa	0,5 U	0,04 U

Apéndice D. Electroferograma de fragmento del gen Cyt b de *Haemoproteus archilochus* obtenido con el cebador HaemR2 diseñado por Bensch et al., (2000).

