

**Prevalencia y diversidad de hemoparásitos causantes de malaria en comunidades de aves  
del departamento de Santander, Colombia**

**Daniela Villamizar Escalante**

**Trabajo de Grado como requisito para optar por el título de Bióloga**

**Director**

**Fernando Rondón González**

**Doctor en Biología**

**Codirectora**

**Erika Martins Braga**

**Doctora en Parasitología**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2017**

### **Agradecimientos**

A mis padres por su ayuda y apoyo incondicional durante estos años de estudio, a mi hermano por siempre motivarme a seguir adelante, a Will por siempre apoyarme, motivarme y ayudarme en cada paso de esta etapa.

Al profe Fernando por su paciencia, su aporte de conocimientos, apoyo y gran ayuda durante la realización de este proyecto y durante mi formación como bióloga.

A los integrantes del LGPC-UIS por su ayuda en campo, su paciencia y compañerismo.

A los propietarios de las fincas que nos acogieron amablemente en cada salida de campo.

A la dirección de relaciones exteriores y a su programa de movilidad.

A la profesora Erika, por recibirme con gran acogida y amabilidad en el laboratorio de malaria de la UFMG en Brasil.

A los integrantes del laboratorio de Malaria de la UFMG por ayudarme a fortalecer los conocimientos necesarios para la realización de este trabajo y por recibirme con cariño en el laboratorio.

A Luisa, Ximena y todos mis amigos y compañeros de la carrera por acompañarme en este proceso.

A La Menina por todas las locuras, risas y apoyo en Brasil, a Luis, Lizeth y todos los que estuvieron conmigo durante mi estadía allá, por hacer ese tiempo aún más divertido.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	11
1. Marco Teórico.....	14
1.1. Malaria Aviar .....	14
1.1.1. Generalidades de hemoparásitos causantes de Malaria aviar. ....	14
1.1.2. Consecuencias a causa de la Malaria en poblaciones de Aves. ....	15
1.2. Métodos de identificación de hemosporidios en aves.....	16
1.2.1. Microscopía.....	16
1.2.2. Herramientas Moleculares. ....	17
1.3. Estudios de parásitos hemosporidios causantes de malaria aviar .....	18
1.3.1. Estudios realizados en el neotrópico.....	18
1.3.2. Estudios realizados en Colombia. ....	19
2. Materiales y Métodos.....	20
2.1. Área de estudio .....	20
2.2. Muestreo .....	22
2.3. Fase de laboratorio.....	22

2.4. Análisis de secuencias.....	24
2.5. Análisis estadístico.....	24
3. Resultados.....	25
3.1. Frecuencia de aves infectadas por plasmodium y/o haemoproteus .....	25
3.2. Identificación de secuencias .....	26
3.3. Prevalencia de infección de acuerdo con las localidades y especies infectadas .....	27
3.4. Distribución de linajes .....	31
3.5. Composición de linajes de hemosporidios y especies de aves .....	34
4. Discusión.....	39
4.1. Técnicas de identificación de parásitos hemosporidios .....	40
4.2. Prevalencia de infección de acuerdo con las localidades y especies de aves analizadas.....	42
4.3. Distribución de linajes .....	46
4.4. Composición de linajes de hemoparásitos y de especies de aves .....	48
5. Conclusiones.....	50
6. Recomendaciones .....	51
Referencias Bibliográficas .....	52
Apéndices.....	63

### Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Área de estudio ubicada en el departamento de Santander, Colombia. Negro: San Benito (SB); Blanco: San Bernardo La Cuchilla (B); Rosado: El Aburrido (A); Azul: La Colorada (C); Verde: Los Helechales (H); Celeste: El Salado (S). .....	21
Figura 2. Frecuencia de infección por Plasmodium/Haemoproteus en 585 muestras de Aves capturadas en seis localidades del departamento de Santander (Colombia). SB: San Benito; B: San Bernardo La Cuchilla; A: El Aburrido; C: La Colorada; H: Los Helechales y S: El Salado, siguiendo el protocolo descrito por Fallon et al., (2003). .....	26
Figura 3. Prevalencia (%) de los géneros de parásitos hemosporidios identificados en las localidades de estudio. SB: San Benito; B: San Bernardo La Cuchilla; A: El Aburrido; C: La Colorada; H: Los Helechales y S: El Salado. ....	31
Figura 4. Composición de linajes de parásitos hemosporidios y especies de aves obtenidos con análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). Se representan los espacios de ordenación del NMDS de los linajes de parásitos (A) y las especies de aves (B) por localidad de muestreo. SB: San Benito; B: San Bernardo La Cuchilla; A: El Aburrido; C: La Colorada; H: Los Helechales y S: El Salado. ....	36
Figura 5. Curva de rarefacción, riqueza en las seis localidades de estudio. A. linajes de parásitos hemosporidios; B. especies de Aves encontradas. SB: San Benito, B: San Bernardo La Cuchila, A: El Aburrido, C: La Colorada, H: Los Helechales, S: El Salado. ....	39

### Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Numero de aves infectadas por parásitos hemosporidios en las seis localidades de estudio en el departamento de Santander (Colombia). H: Haemoproteus; P: Plasmodium; L: Leucocytozoon .....	28
Tabla 2. Linaje de hemosporidios encontrados y sus frecuencias. Se listaron las especies hospederas donde fueron encontrados estos linajes y la localidad involucrada, así como el código de los linajes reportados anteriormente en GenBank.....	32
Tabla 3. Análisis de similaridad ANOSIM de la composición de linajes de parásitos hemosporidios y especies de Aves en las localidades de estudio. A. Evaluación de la hipótesis uno. B. Evaluación de las hipótesis dos a siete.....	37

### Lista de Apéndices

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Producto de PCR anidada (524pb) usando los cebadores Haemf y HaemR2 (Helgreen et al., 2004). .....	63
Apéndice B. Nomenclatura utilizada, para llevar a cabo el análisis NMDS, de los distintos muestreos realizados en las localidades de estudio.....	64

## Resumen

**TÍTULO:** PREVALENCIA DE HEMOPARÁSITOS CAUSANTES DE MALARIA PRESENTES EN COMUNIDADES DE AVES DE DIFERENTES LOCALIDADES DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER, COLOMBIA\*.

**AUTOR:** DANIELA VILLAMIZAR ESCALANTE\*\*

**PALABRAS CLAVE:** MALARIA AVIAR, PCR-ANIDADA, PARÁSITOS HEMOSPORIDIOS

### DESCRIPCIÓN:

La presencia de parásitos causantes de malaria aviar puede influenciar muchos aspectos en la vida de los hospederos que puede verse reflejados en la pérdida de peso corporal y condición física, en el incremento del riesgo de depredación, la reducción del éxito reproductivo, entre otros; factores que afectan las comunidades y poblaciones de aves a nivel mundial. Todos estos aspectos pueden estar relacionados con alteraciones ambientales como consecuencia de la degradación de hábitats, que pueden afectar las interacciones parásito-hospedero. Los estudios sobre estos parásitos en el neotrópico han sido escasos y el conocimiento sobre la prevalencia y el impacto de esta enfermedad en Colombia es limitado. Esta investigación se llevo a cabo en seis localidades del departamento de Santander-Colombia a diferentes alturas (902 a 3417msnm). Se determinó la infección por parásitos hemosporidios mediante el uso de PCR-anidada (secuencias de un fragmento del gen Cyt b presente en estos parásitos) en 585 muestras de aves pertenecientes a 25 familias (109 especies). Se encontró que el 24% de las muestras estudiadas estuvieron infectadas por al menos un genero o subgénero de hemosporidio (*Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*), se encontraron 35 linajes diferentes, de los cuales 17 son reportados por primera vez. Se observó a Thraupidae como la familia más susceptible de ser infectada y al género *Haemoproteus* (subgénero *Parahaemoproteus*) como el más prevalente en todas las localidades contempladas y afectando a la mayoría de especies de aves hospederas. Este estudio sirve como base para futuros estudios en diferentes temas de biología de la conservación incluyendo ecología, sistemática, filogeografía y genética de poblaciones.

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de ciencias. Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González, Doctor En Ciencias Biológicas. Codirectora Erika Martins Braga Doctora en Parasitología

### Abstract

**TITLE:** PREVALENCE OF AVIAN MALARIA PARASITES PRESENT IN BIRD'S COMMUNITIES OF DIFFERENT LOCALITIES IN THE DEPARTMENT OF SANTANDER, COLOMBIA\*.

**AUTHOR:** DANIELA VILLAMIZAR ESCALANTE\*\*

**KEY WORDS:** AVIAN MALARIA, NESTED-PCR, HAEMOSPORIDIAN PARASITES

#### Description:

Presence of Avian malaria parasites can influence many aspects of host life, like weight loss, physical condition, increase in the risk of depredation, reduction in reproductive success and many others, affecting bird communities and populations worldwide. All of these aspects may be related to environmental alterations as a consequence of loss and habitat degradation that can affect host-parasite interaction. Surveys about these parasites in the Neotropics have been less studied, and knowledge about prevalence and impact of the disease in Colombia is limited. We perform a study in six localities from the department of Santander-Colombia at different altitudes (902 to 3417asl). We determined avian haemosporidian infection using Nested-PCR (sequencing a fragment of the Cyt b gene present in these parasites) in 585 bird samples from 25 families (109 species). From the sampled birds, 24% were infected by at least one genus or subgenus of haemosporidian (*Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*), 35 lineages were found and 17 of them are reported for the first time. We found Thraupidae as the most susceptible family to be infected, also *Haemoproteus* (subgenus *Parahaemoproteus*) was found as the most common genus at all localities and it's affecting the majority of host bird species. This study serves as basis for future studies in different topics of conservation biology including ecology, systematic, phylogeography and population genetics.

---

\* Degree work.

\*\* Science Faculty. School of Biology. Director: Fernando Rondón González, Doctor in Biological Sciences. Codirectora Erika Martins Braga Doctora en Parasitología

## Introducción

La Malaria aviar es conocida como una enfermedad infecciosa generalmente producida por parásitos hemosporidios del género *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (Valkiūnas, 2005; Cadena-Ortiz, 2015), es transmitida por diferentes vectores generalmente de la familia Ceratopogonidae, Simuliidae y Culicidae (Santiago-Alarcon et al., 2012; Lotta et al., 2013; Bazán-Quijada, 2014; Cadena-Ortiz, 2015) e infecta la sangre y otros órganos de sus hospederos (Pérez-Tris et al., 2005). Los hemosporidios del género *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* presentan distribuciones amplias hacia todos los continentes exceptuando la antártica (Valkiūnas et al., 2008) y se caracterizan por afectar la mayoría de las especies de aves, especialmente del orden Passeriformes (LaPointe et al., 2012).

El estudio de los parásitos hemosporidios solía desarrollarse únicamente mediante el uso de microscopía y un diagnóstico positivo dependía de la visualización de parásitos presentes en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa (Waldenström et al., 2004). Este método ha aportado importantes conocimientos en la ecología y biología general de los hemosporidios como el ciclo de vida, historia natural y distribución geográfica de los hospederos afectados (Valkiūnas et al., 2008), así como estimaciones de la intensidad de la infección, entre otros. Sin embargo, a pesar de ser una técnica de bajo costo, requiere de tiempo, personal entrenado y los resultados en la detección e identificación de los parásitos no son totalmente fiables (Braga et al., 2011).

Actualmente el uso de técnicas moleculares basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permiten amplificar secuencias presentes en el DNA mitocondrial (mtDNA) del parásito,

principalmente genes conservados como el citocromo b (cyt b) (Perkins & Schall, 2002; Waldenström et al., 2004; Bensch et al., 2009; Lacorte et al., 2013). Richard et al., (2002) consideran que este método es sensible y específico, dado que permite obtener resultados confiables en menor tiempo.

La secuenciación de genes del mtDNA ha confirmado algunos de los conocimientos adquiridos mediante microscopia, como la identificación de los hemoparásitos involucrados en la infección, la detección de los linajes presentes en alguna región geográfica particular, la evaluación de la diversidad genética, el establecimiento de filogenias útiles en estudios filogeográficos, la especificidad parásito-hospedero y la estimación de la prevalencia del tipo de parásito, entre otros aspectos (Richard et al., 2002; Hellgren et al. 2004; Ribeiro et al., 2004; Valkiūnas et al., 2008; Garamszegi, 2010).

Por otra parte, la infección por hemosporidios aviarios se ha visto asociada a cambios ambientales (Atkinson & LaPointe, 2009) y sus efectos en las aves pueden verse reflejados en la reducción del peso corporal y condición física, lo que puede aumentar el riesgo de depredación y reducir el éxito reproductivo (Sebaio et al., 2012), lo anterior, ocasiona la muerte de individuos, decline poblacional y puede llevar a la extinción de poblaciones e incluso especies de Aves (Basto et al., 2006). Por las razones expuestas es importante establecer la prevalencia de hemosporidios en poblaciones de aves, que permitan generar pautas para llevar a cabo planes de manejo para la conservación de las especies.

En general, los estudios que utilizan herramientas moleculares encaminadas a identificar y establecer la prevalencia de hemosporidios aviares en áreas del neotrópico son escasos (Belo, 2011; Campos, 2012; Harrigan et al. 2014). Pese a esto, se han podido identificar y confirmar la

presencia de especies de hemosporidios presentes en estas zonas y la relación con sus hospederos (Ribeiro et al., 2004; Lacorte et al., 2013; Fecchio et al., 2017a).

En Colombia los estudios sobre malaria aviar en zonas elevadas (entre 2000 y 3900 msnm) se han enfocado principalmente en los departamentos de Cundinamarca (Rodríguez et al., 2009; Lotta et al., 2013; Mantilla et al., 2013a, Mantilla et al., 2013b; Matta et al., 2014), Risaralda (Walther et al., 2014) y Magdalena (Gonzalez-Quevedo et al., 2016), mientras que en zonas bajas (entre 130 y 1200 msnm), se ha realizado principalmente en el departamento del Meta (Rodríguez & Matta, 2001; Matta et al., 2004; Basto et al., 2006) y Antioquia (Londoño et al., 2007), también se han realizado trabajos que incluyen gradientes altitudinales en el país (Valkiūnas et al., 2003; Gonzalez et al., 2014; Gonzalez et al., 2015; Lotta et al., 2016)

Pocos de estos trabajos incluyen el uso de técnicas moleculares para la identificación de los parásitos y la estimación de la prevalencia de los mismos (Mantilla et al., 2013; Walther et al., 2014; Lotta et al., 2015; González et al., 2015; Gonzalez-Quevedo et al., 2016). Para el departamento de Santander, a pesar de la gran diversidad de avifauna presente (Hilty & Brown 1986; Donegan et al., 2010; McMullan et al., 2011), el conocimiento sobre el tipo y la prevalencia de hemoparásitos causantes de malaria aviar es nulo; esto permitió constituir como objetivos del presente trabajo de grado modalidad investigación, establecer la frecuencia de Aves infectadas por hemoparásitos, identificar el tipo de hemoparásito involucrado en la infección, mediante el uso de herramientas moleculares, y estimar la prevalencia de hemoparásitos aviarios en localidades comprendidas en un gradiente altitudinal (902 a 3417msnm), caracterizadas por ser zonas agrícolas y ganaderas, principalmente.

## 1. Marco Teórico

### 1.1. Malaria Aviar

Malaria aviar es un término que ha sido otorgado a la enfermedad infecciosa causada por parásitos del orden Hemosporida (Valkiūnas, 2005), parásitos ampliamente distribuidos, presentes en la mayoría de especies de aves, principalmente en las del orden Passeriformes (LaPointe et al., 2012). Anteriormente, este término solo hacía referencia al género *Plasmodium* (Garnham, 1966). Sin embargo, también se han incluido los géneros *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*; siendo estos los principales géneros causantes de malaria encontrados en las aves (Valkiūnas, 2005).

**1.1.1. Generalidades de hemoparásitos causantes de Malaria aviar.** Los hemosporidios son transmitidos a través de vectores, principalmente dípteros hematófagos (González, 2013). Entre los géneros mencionados, *Plasmodium* se encuentra clasificado como el más virulento y las aves infectadas por este pueden presentar una fase aguda donde los niveles de parasitemia son altos, o una fase crónica o latente donde los niveles de parasitemia son bajos y el ave no muestra señales de infección (Atkinson & van Riper, 1991; Santiago-Alarcon & Carbó-Ramírez, 2015). Entre sus vectores se encuentran los dípteros pertenecientes a la familia Culicidae y Ceratopogonidae (González, 2013; Cadena-Ortiz, 2015).

Por su parte *Haemoproteus* se divide en dos subgéneros (Valkiūnas, 2005). El subgénero *Haemoproteus*, el cual infecta únicamente a aves del orden Columbiformes y, el subgénero *Parahaemoproteus*, considerado como el más común y generalista en las aves silvestres, infectando ordenes diferentes a los Columbiformes (Moens & Pérez-Tris, 2016). En cuanto a los vectores que transmiten parásitos del género *Haemoproteus*, se han descrito dípteros de las familias Hippoboscidae y Ceratopogonidae (Atkinson et al., 2008; Belo, 2011; Bazán-Quijada, 2014).

Para el género *Leucocytozoon*, los estudios han sido escasos y se conoce que es transmitido principalmente por vectores de la familia Simuliidae (Santiago-Alarcon et al., 2012), con una única especie transmitida por Ceratopogonidae (Lotta et al., 2013).

Los hemosporidios de los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* comparten algunas características en sus ciclos de vida, siendo ciclos heteroxenos que involucran un hospedero vertebrado y un vector invertebrado (Santiago-Alarcon & Carbó-Ramírez, 2015). La transmisión ocurre cuando el vector se alimenta de un ave infectada donde ingiere formas sexuadas o gametocitos; dentro del vector se llevará a cabo la etapa de reproducción sexual y a través de la picadura, el hospedero será infectado ocurriendo en él la etapa de reproducción asexual (Belo, 2011). *Plasmodium* es el único de estos géneros de hemosporidios capaz de realizar reproducción asexual en la sangre periférica de su hospedero, una de las razones por las que se considera altamente virulento (Santiago-Alarcon & Carbó-Ramírez, 2015).

**1.1.2. Consecuencias a causa de la Malaria en poblaciones de Aves.** La malaria aviar presenta un grado de patogenicidad variable y es considerada como un regulador del tamaño

poblacional de sus hospederos (Sebaio et al., 2012); puede llegar a ser asintomática, aunque puede causar morbilidad y mortalidad en poblaciones naturales (Braga et al. 2011).

Estudios muestran que la infección por malaria está relacionada a factores ambientales como temperatura, altitud y deterioro del habitat y ocasionan efectos en el hospedero como disminución del peso y condición corporal, pérdida de la capacidad reproductiva, incremento del riesgo de depredación (Marzal, 2005; Møller & Nielsen 2007; Knowles et al., 2010; Sebaio et al., 2012), así como cambios en el comportamiento, entre otras consecuencias que afectan la biodiversidad causando el decline de poblaciones naturales (Basto et al., 2006; Belo, 2011) y la pérdida de diversidad genética (Campos, 2012).

## 1.2. Métodos de identificación de hemosporidios en aves

**1.2.1. Microscopía.** La identificación de los hemosporidios en Aves suele ser realizada mediante la observación microscópica basada en características morfológicas del parásito, usando frotis sanguíneos teñidos con Giemsa (Waldenström et al., 2004); este método ha aportado grandes conocimientos en la investigación de estos parásitos, permitiendo comprender gran parte de su ecología e historia natural (Valkiūnas et al., 2008).

Sin embargo, existen factores que han afectado la credibilidad de este método, por ejemplo, permite la identificación de *Plasmodium* solo a nivel de subgénero, debido a que generalmente las aves capturadas se encuentran en la fase crónica o latente, presentando entonces un bajo nivel de parasitemia lo que dificulta la clasificación a nivel de especie, pues para esto se necesitan todas las etapas del parásito presentes solo en infecciones agudas (Braga et al., 2011). No obstante, para *Haemoproteus*, la diferenciación entre especies es menos complicada, puesto

que en los frotis es posible observar las características necesarias para la identificación (Valkiūnas, 2005).

La detección de infecciones mixtas (infecciones que involucran dos tipos de parásitos, ya sea del mismo género o no y afectan a un solo hospedero), representa otro obstáculo para la identificación correcta de hemosporidios mediante este método (Palinauskas et al., 2009). A pesar de que el método de microscopía óptica esté altamente cuestionado, en la actualidad sigue siendo usado como patrón para la detección de parásitos en aves, pues tiene ventajas como; el ser un método de bajo costo y fácil acceso, además de ayudar en la determinación o verificación de la identidad e intensidad de la infección (Valkiūnas et al., 2008).

**1.2.2. Herramientas Moleculares.** La introducción de técnicas moleculares basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de infección por parásitos hemosporidios ha permitido incrementar el número de estudios a nivel mundial (Hellgren et al., 2009; Clark et al. 2014), puesto que se ha demostrado que es una técnica sensible con protocolos que detectan infección incluso con bajas concentraciones de DNA del parásito, además de infecciones mixtas (Fallon et al., 2003).

Los primeros estudios realizados usando técnicas basadas en PCR para la detección de la infección, utilizaron secuencias del gen ribosomal 18S de *Plasmodium*, marcador que fue útil para la identificación del parásito a nivel de especie (Feldman, 1995; Richard et al., 2002; Jarvi et al., 2002). Sin embargo, fue un método poco confiable, pues se obtenían bandas extras generalmente pertenecientes al DNA del ave, lo que dificultaba la secuenciación y por ende la identificación de los parásitos presentes.

En busca de una solución a la dificultad presentada, se definió al gen citocromo b (cyt b) como marcador molecular para la identificación de los linajes de parásitos (Bensch et al. 2000). Éste hecho permitió establecer que la diversidad de parásitos causantes de malaria aviar, es tan grande como la diversidad de sus hospederos (Bensch et al. 2000; Ricklefs & Fallon 2002; Perkins & Schall, 2002; Fallon et al., 2003; Lacorte et al., 2013).

Actualmente, el uso del cyt b como marcador es el método más confiable para la detección de hemosporidios en aves, normalmente se realiza una PCR diagnóstica dirigida a amplificar este gen en el DNA de *Plasmodium* y/o *Haemoproteus* (Fallon et al., 2003) a partir de muestras de sangre del hospedero. Sin embargo esta reacción no es suficiente para la identificación del parásito, además de no detectar infecciones por *Leucocytozoon* (Fallon et al., 2003). Lo anterior fue superado por Hellgren et al., (2004), quienes desarrollaron una PCR anidada que incluye el uso de dos reacciones de PCR diferentes dirigidas a la detección de *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* y cuyo producto de ayuda a la identificación de estos parásitos a nivel de especie, así como la detección de infecciones mixtas.

### **1.3. Estudios de parásitos hemosporidios causantes de malaria aviar**

**1.3.1. Estudios realizados en el neotrópico.** Los primeros estudios realizados sobre parásitos hemosporidios causantes de malaria en aves se enfocaron en áreas templadas de Europa, África y Norte América (Huff, 1965; Bennett et al., 1992; Atkinson, 2000; Valkiūnas, 2005; Ortego et al., 2007; Valkiūnas et al., 2008), dejando de lado las zonas neotropicales. No obstante, los estudios en el neotrópico han aumentado significativamente en las últimas décadas (Braga et al., 2011; Belo, 2011; Belo et al., 2011; González, 2013; González et al., 2014),

permitiendo la descripción de nuevas especies de hemosporidios (Valkiūnas et al., 2010; Mantilla et al., 2013a; Mantilla et al. 2013b; Matta et al., 2014; Gallen & Witt, 2014; Lotta et al., 2015) además de aportar grandes conocimientos para el estudio de la ecología y evolución de estos parásitos (Svensson-Coelho et al., 2014; Santiago-Alarcon et al., 2014).

**1.3.2. Estudios realizados en Colombia.** En Colombia, hasta hace unos años los estudios en malaria aviar establecían la prevalencia de hemoparásitos mediante la observación de frotis sanguíneos a través del microscopio (Valera & Ayala, 1974; Bennett y Borrero 1976; Rodríguez & Matta, 2001; Valkiūnas et al., 2003; Matta et al., 2004; Basto et al., 2006; Londoño et al., 2007; González et al., 2014).

Recientemente se han realizado estudios que involucran el uso de técnicas moleculares, lo que ha permitido la identificación de nuevas especies de hemosporidios en el país. Estos estudios en su mayoría están enfocados a establecer la prevalencia e identificar los parásitos hemosporidios que infectan las aves de zonas elevadas (entre 2000 y 3900 msnm), sin embargo existen algunos que se llevaron a cabo en aves de zonas bajas (entre 130 y 1200 msnm). Estos trabajos se realizaron en diferentes localidades de los departamentos de Risaralda (Walther et al., 2014), Cundinamarca (Lotta, 2010; Lotta et al., 2013), Nariño (Lotta et al., 2015), Meta (Lotta et al., 2016) y Magdalena (Gonzalez-Quevedo et al., 2016). Actualmente, estudios realizados en el departamento de Santander son nulos y en Colombia, los que incluyan un gradiente altitudinal son escasos, evidenciando la falta de información sobre los tipos de parásitos hemosporidios que infectan a las comunidades de aves en este departamento del nororiente colombiano y la prevalencia de los mismos.

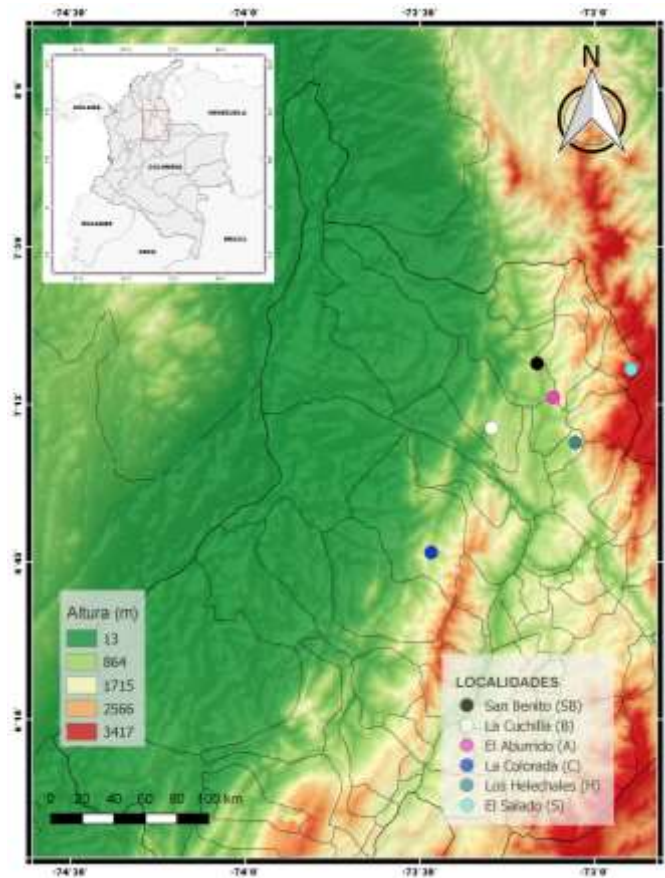
## 2. Materiales y Métodos

El presente trabajo de grado se encuentra enmarcado dentro de las actividades avaladas por la resolución N° 0047 de Enero 22 de 2015, expedida por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA), la cual otorga el permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial a la Universidad Industrial de Santander.

### 2.1. 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 San Benito, Municipio de Rionegro (SB) (902msnm); 2) Vereda San Bernardo la Cuchilla, Municipio de Lebrija (B) (966msnm); 3) Vereda El Aburrido Alto, Municipio de Bucaramanga (A) (1132msnm); 4) Vereda La Colorada, Municipio de San Vicente de Chucuri (C) (1264msnm); 5) Vereda Los Helechales, Municipio de Floridablanca (H) (1309msnm) y 6) Vereda El Salado, Municipio de Vetás (S) (3417msnm). Las localidades uno a cinco se caracterizan por la presencia de sistemas agroforestales como cultivos de cacao (*Theobroma cacao*), aguacate (*Persea americana*), plátano (*Musa paradisiaca*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y cítricos (*Citrus sp.*), así como zonas de ganadería extensiva. Sin embargo, algunas de las localidades cuentan con relictos de bosque secundario intervenido, donde se

podrán encontrar aves asociadas a este tipo de vegetación (Donegan et al., 2010). La localidad seis es un ecosistema de alta montaña de gran importancia para la conservación, debido a la riqueza de especies y el alto grado de endemismos presentes (Morales-Betancourt et al., 2006), además de caracterizarse por presentar fragmentos de bosque altoandino que limita con áreas de páramo azonal con vegetación frailejonal-pajonal y arbustiva (Medina et al., 2015).



*Figura 1.* Área de estudio ubicada en el departamento de Santander, Colombia. Negro: San Benito (SB); Blanco: San Bernardo La Cuchilla (B); Rosado: El Aburrido (A); Azul: La Colorada (C); Verde: Los Helechales (H); Celeste: El Salado (S).

## 2.2. Muestreo

En cada localidad se realizaron al menos tres muestreos. Cada muestreo tuvo un esfuerzo de 12 horas (5:30 h a 17:30 h), donde se usaron 11 redes de niebla ubicadas a lo largo del ecotono de los cultivos y los remanentes de bosque. Las aves fueron capturadas entre Febrero de 2012 y Febrero de 2016, se identificaron con la ayuda de guías de campo (Hilty & Brown 1986; McMullan et al., 2011; Restall et al., 2006). A cada ave capturada se le tomaron 50 $\mu$ l de sangre a partir de la vena braquial, mediante el uso de jeringas de punta fija de 1ml. Cada muestra se almacenó en tubos Eppendorff de 1,5ml con 50 $\mu$ l de Etanol absoluto, posteriormente se etiquetaron con las dos iniciales del epíteto genérico, las dos iniciales del epíteto específico y el número de captura del individuo y fueron preservadas en frío hasta ser procesadas en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación (LGPC-UIS), adscrito al Grupo de Investigación en Microbiología y Genética de la Universidad Industrial de Santander, finalmente los individuos capturados fueron anillados antes de su liberación para evitar replica de muestras (Geupel et al., 1997).

## 2.3. Fase de laboratorio

A partir de las muestras almacenadas se realizó la extracción de DNA usando Fenol-Cloroformo siguiendo el protocolo descrito por Sambrook et al., (2001). Para establecer la frecuencia de muestras infectadas por malaria aviar se amplificó un fragmento del DNA mitocondrial (mtDNA) de los parásitos hemosporidios por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando los cebadores 343R y 496F y siguiendo el protocolo descrito por Fallon et al.

(2003). La amplificación de un fragmento de 196pb es indicadora de infección por *Plasmodium* y/o *Haemoproteus*.

Para confirmar la infección y establecer la prevalencia de la misma, sólo las muestras de DNA que amplificaron exitosamente para el mtDNA del parásito fueron usadas en una reacción de PCR anidada, utilizando los cebadores y el protocolo descrito por Hellgren et al., (2004). Con los cebadores HaemNFI y HaemNR3 se realizó la primera reacción, en la segunda se usaron los cebadores HaemF y HaemR2, que permiten la identificación de *Plasmodium* y/o *Haemoproteus*. Para *Leucozytozoon* se utilizaron los cebadores HaemFL y HaemR2L para la segunda reacción y se realizó para la totalidad de las muestras, sin filtrarlas mediante el protocolo de Fallon et al., (2003). Estos cebadores se encuentran dirigidos a amplificar regiones conservadas del gen citocromo b (cyt b) de los parásitos antes mencionados. En la segunda reacción con los cebadores HaemF y HaemR2 se realizó una modificación al protocolo de PCR aumentando tanto la concentración de MgCl<sub>2</sub> a 2,4 mM, como la temperatura de annealing a 52°C. La amplificación de un fragmento de 584pb indica la infección por los parásitos mencionados.

Tanto los productos de la primera PCR así como los de la PCR anidada, se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con AgNO<sub>3</sub> (Santos et al., 1993).

Los productos de PCR obtenidos en la reacción anidada fueron usados como molde para obtener secuencias que permitieron la identificación de los hemoparásitos presentes en las muestras estudiadas, dichos productos se purificaron siguiendo el protocolo descrito por Sambrook et al. (2001) y se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Malaria de la Universidad Federal de Minas Gerais.

#### 2.4. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se alinearon, se verificó su calidad y se editaron cuidadosamente en los programas DNA Baser v.3.2 (Heracle BioSoft, 2013) y MEGA v.6.06 (Tamura et al., 2011). El género de cada linaje se dedujo mediante el uso de la herramienta NCBI-BLAST (Altschul et al., 1990) teniendo en cuenta la secuencia mas cercana obtenida. Se compararon las secuencias con los registros de las bases de datos de GenBank® y MalAvi (Bensch et al., 2009) debido a que contienen información sobre el gen *cyt b* para la mayoría de los linajes de parásitos hemosporidios que infectan las aves. Las secuencias que no coincidieron con ninguna información de las bases de datos se consideraron como un nuevo linaje (se definió como nuevo linaje aquella secuencia del *cyt b* que difiere en al menos un par de bases como lo describen Harrigan et al., 2014), se les asignó un nombre siguiendo la nomenclatura dada en MalAvi y serán depositadas en las bases de datos GenBank® y MalAvi (datos no mostrados).

#### 2.5. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) en el programa PAST (Hammer O et al., 2009) teniendo en cuenta la fecha de cada salida de campo realizada en cada localidad, para buscar las diferencias entre la composición de linajes de parásitos en las localidades bajo estudio, se realizó de igual manera para la composición de aves. Asimismo, se realizó un análisis de similaridad (ANOSIM) para evaluar si existían diferencias significativas en la composición de parásitos y aves entre las localidades, para esto se plantearon siete hipótesis donde se comparó en primer lugar la composición entre todas las localidades

(SBvsBvsAvsCvsHvsS), seguido a esto, se realizaron las siguientes seis hipótesis donde se comparó cada localidad por separado contra las localidades restantes (2. SB vs B+A+C+H+S; 3. A vs SB+B+C+H+S; 4. C vs SB+B+A+H+S; 5. H vs SB+B+A+C+S; 6. S vs SB+B+A+C+H).

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis de rarefacción en el programa R (R Development Core Team 2011) donde se evaluó la riqueza tanto de parásitos como de aves presentes en las muestras estudiadas y, teniendo en cuenta la riqueza obtenida, se realizó una correlación de Spearman (debido a que los datos no presentan una distribución normal) para observar la posible influencia de la riqueza de aves sobre la riqueza de parásitos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Frecuencia de aves infectadas por plasmodium y/o haemoproteus

Se analizaron en total 585 muestras correspondientes a 109 especies pertenecientes a 25 familias de Aves, de las cuales, 74 muestras fueron tomadas en San Benito, 67 en San Bernardo La Cuchilla, 97 en El Aburrido, 184 en La Colorada, 133 en Los Helechales y 30 en El Salado.

El método propuesto por Fallon et al., (2003) permitió identificar 267 muestras infectadas (46%), pertenecientes a 67 especies de 19 familias. La frecuencia de infección se distribuyó en las familias entre el 0,4% (Tytiridae, Cathartidae, Cotingidae, Cuculidaa e Hirundinidae) y 55% (Thraupidae), siendo precisamente Thraupidae la familia que presenta una mayor frecuencia de

infección en todas las localidades consideradas, que va desde 39% en San Benito hasta 89% en El Salado (Figura 2).

### 3.2. Identificación de secuencias

A partir de las 267 muestras detectadas siguiendo el protocolo descrito por Fallon et al., (2003), el 52,8% (141 muestras) mostraron infección por parásitos causantes de Malaria aviar con el método descrito por Hellgren et al., (2004), el cual consiste en amplificar un fragmento de 478 pb del gen citocromo b (cyt b) presente en el mtDNA de los parásitos hemosporidios (Anexo 1).

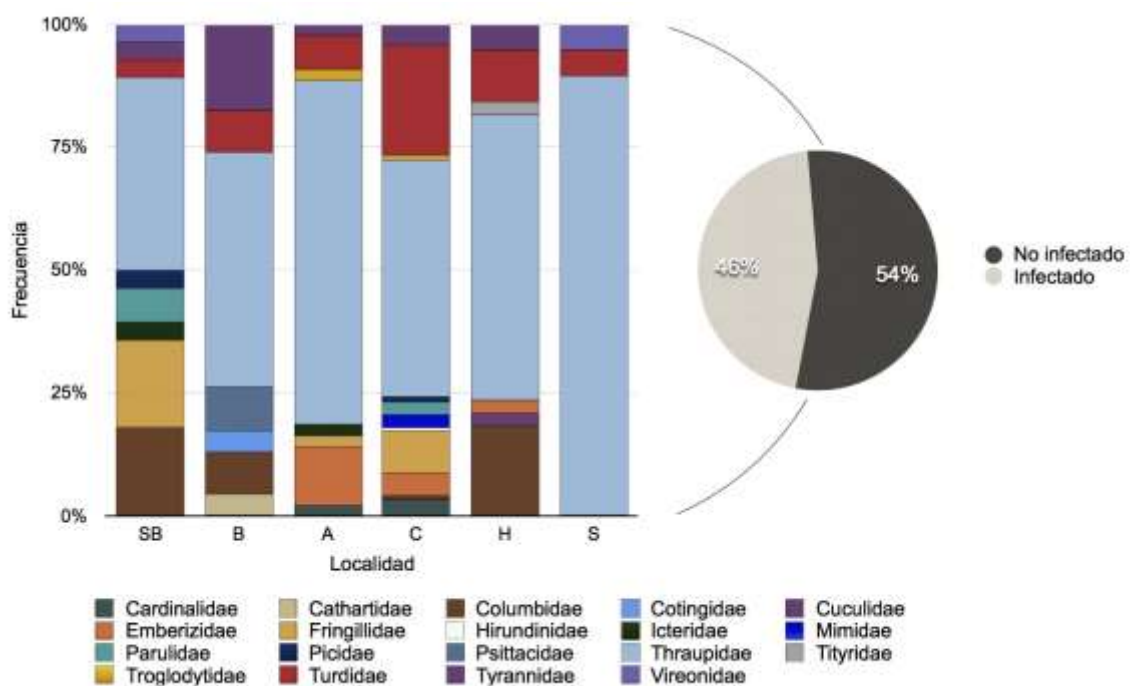


Figura 2. Frecuencia de infección por Plasmodium/Haemoproteus en 585 muestras de Aves capturadas en seis localidades del departamento de Santander (Colombia). SB: San Benito; B: San Bernardo La Cuchilla; A: El Aburrido; C: La Colorada; H: Los Helechales y S: El Salado, siguiendo el protocolo descrito por Fallon et al., (2003).

En la verificación de los productos de PCR se tuvo como control positivo de amplificación a *Plasmodium gallinaceum*, aislado a partir de *Gallus gallus*, con código del GenBank AY099029.1, y *Leucocytozoon sp.*, aislado a partir de la muestra L\_ZOCAP\_07 con código del GenBank KF717054.1 (Lotta et al., 2016), ambas facilitadas por el laboratorio de Malaria de la UFMG.

Todas las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos del GenBank y MalAvi. A partir de las 141 muestras se identificaron 66 secuencias positivas para el subgénero *Parahaemoproteus* (46,8%), 28 para *Plasmodium* (19,8%), 8 para el subgénero *Haemoproteus* (5,6%) y 2 para *Leucocytozoon* (1,4%); las muestras restantes (37) fueron secuencias de calidad deficiente y no fueron tenidas en cuenta para posteriores análisis.

### 3.3. Prevalencia de infección de acuerdo con las localidades y especies infectadas

De las 109 especies consideradas en el estudio 28 pertenecientes a 11 familias se encontraron infectadas (24,8%), de estas, seis son especies migratorias (21,4%) y una endémica (Tabla 1).

Del total de muestras analizadas el 24,1% presentó infección por al menos un hemosporidio. Para la localidad de San Benito el 4,1% de las muestras presentaron infección por al menos un género de hemoparásito, en San Bernardo La Cuchilla la infección se presentó en el 19,4% de las aves capturadas, mientras que en El Aburrido fue del 25,8%, en La Colorada la infección se estimó en 27,7%, en Los Helechales la infección alcanzó el 6,8% y en El Salado el 10% de las muestras se encontraron infectadas.

Tabla 1.

Numero de aves infectadas por parásitos hemosporidios en las seis localidades de estudio en el departamento de Santander (Colombia). H: *Haemoproteus*; P: *Plasmodium*; L: *Leucocytozoon*

Familia	Especies	San Benito (n=74)			La Cuchilla (n=67)			El Aburrido (n= 97)			La Colorada (n=184)			Los Helechales (n=133)			El Salado (n=30)		
		H	P	L	H	P	L	H	P	L	H	P	L	H	P	L	H	P	L
Cathartidae	<i>Cathartes aura</i>				1														
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>				2														
Tyrannidae	<i>Tyrannus melancholicus</i>				1														
Vireonidae	<i>Vireo altiloquus</i> *																	1 <sup>▲</sup>	
Turdidae	<i>Catharus ustulatus</i> *										4								
	<i>Turdus flavipes</i>							2		1									
	<i>Turdus ignobilis</i>					1				4									
Thraupidae	<i>Chlorophanes spiza</i>					1													
	<i>Dacnis hartlaubi</i> ♦										1								
	<i>Dacnis lineata</i>										1								
	<i>Diglossa humeralis</i>																		1
	<i>Eucometis penicillata</i>									1 <sup>▲</sup>	1								
	<i>Tangara cyanicollis</i>								4 <sup>*</sup>		2 <sup>▲</sup>								
	<i>Tangara guttata</i>								2 <sup>▲</sup>										
	<i>Tangara gyrola</i>										1			1 <sup>▲</sup>					
	<i>Tangara heinei</i>								5 <sup>**</sup>										
	<i>Tangara inornata</i>													1					
	<i>Tangara vitriolina</i>						1		4 <sup>▲</sup>					1 <sup>▲</sup>					
	<i>Thraupis episcopus</i>					5 <sup>▲</sup>			2 <sup>▲</sup>		23 <sup>▲</sup>			4 <sup>▲</sup>					
	<i>Thraupis palmarum</i>		2 <sup>▲</sup>			1 <sup>▲</sup>			1 <sup>▲</sup>		5 <sup>▲</sup>			1 <sup>▲</sup>					
Emberizidae	<i>Arremonops conirostris</i>								1 <sup>▲</sup>	2			1						
	<i>Zonotrichia capensis</i>										2		1						1
Cardinalidae	<i>Pheucticus ludovicianus</i> *							1				1							
	<i>Piranga rubra</i> *											1							
Parulidae	<i>Setophaga castanea</i> *		1																
	<i>Setophaga fusca</i> *										1								
Icteridae	<i>Icterus chrysater</i>								1										
Fringillidae	<i>Euphonia laniirostris</i>										1 <sup>▲</sup>								
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>3</b>			<b>13</b>			<b>25</b>			<b>51</b>			<b>9</b>			<b>3</b>		

\*Especies migratorias ♦ Especies endémicas ▲ Todo *Parahaemoproteus* \* 1 *Haemoproteus*, 4 *Parahaemoproteus*. \*\* 1 *Haemoproteus*, 5 *Parahaemoproteus*.

Después de corroborar la infección con el método de Hellgren et al., (2004), la familia Thraupidae continuó presentando la mayor prevalencia de infección con el 65% de las muestras infectadas, al comparar con las demás familias estudiadas. Además Thraupidae presentó la mayor cantidad de especies (46,4%) infectadas, encontrándose desde una en San Benito y El Salado hasta siete en La Colorada.

En cuanto a la prevalencia de las especies, *Cathartes aura* y *Columbina talpacoti* (no passeriformes) mostraron una infección del 2,88%, ambas afectadas por el subgénero *Haemoproteus* en la localidad San Bernardo La Cuchilla.

En La Colorada se encontró a *Eucometis penicillata* infectada por el subgénero *Parahaemoproteus* y el género *Plasmodium*. *Tangara heinei* presentó infección por los subgéneros *Parahaemoproteus* y *Haemoproteus* en El Aburrido; *Thraupis palmarum* se encontró infectada por *Parahaemoproteus* en todas las localidades en las que estuvo presente. El 32,7% de las muestras secuenciadas correspondieron a *Thraupis episcopus*, especie que se encontró infectada únicamente por el subgénero *Parahaemoproteus* (Tabla 1).

*Turdus flavipes* y *Turdus ignobilis* se encontraron infectados (2,9% y 4,8%, respectivamente) por *Plasmodium* en tres localidades diferentes, siendo La Colorada común para las dos especies. *Tangara cyanicollis* se encontró infectada (5,8%) en El Aburrido por los subgéneros *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* y en La Colorada únicamente por *Parahaemoproteus*, mientras que *Tangara gyrola* (1,9%) en La Colorada se encontró infectada por *Plasmodium* y en Los Helechales por el subgénero *Parahaemoproteus* (Tabla 1).

Se detectó la infección por los subgénero *Parahaemoproteus* y *Haemoproteus* y por el género *Plasmodium* en *Tangara vitriolina* (5,8%). *Zonotrochia capensis* fue otra especie donde se detectó la infección (6,7%) por tres parásitos diferentes, *Parahaemoproteus*, *Plasmodium* y

*Leucocytozoon*, de estos, los dos primeros se detectaron en aves de esta especie capturadas en El Aburrado; se destaca también que en esta especie se encontró la única infección por *Plasmodium* en Los Helechales y fue uno de los dos casos donde se identificó la infección por *Leucocytozoon*, el otro correspondió a *Diglossa humeralis* (0,96%), ambas especies capturadas en El Salado (Tabla 1).

La especie endémica *Dacnis hartlaubi* presentó infección (0,96%) por *Plasmodium* en La Colorada y en cuanto a las especies migratorias la mayor prevalencia de infección se encontró en *Catharus ustulatus* (3,8%) seguido de *Pheucticus ludovicianus* (1,9%), las demás especies mostraron una prevalencia de 0,96% cada una. De estas *C. ustulatus*, *Setophaga castanea* y *Piranga rubra* se encontraron infectadas por *Plasmodium*, mientras que en *Setophaga fusca* se detectó infección por el subgénero *Haemoproteus* y en *Vireo altiloquus* por el subgénero *Parahaemoproteus*. Únicamente en *P. ludovicianus* se evidenció infección por dos géneros diferentes de hemoparásitos (Tabla 1).

En cuanto a los parásitos hemosporidios, el subgénero *Parahaemoproteus* se identificó en todas las localidades consideradas, presenta una prevalencia general de 62,5% respecto al total de muestras infectadas distribuida entre 33,3% en El Salado y 77,8% en Los Helechales, siendo dicho subgénero el más frecuente en cinco de las seis localidades consideradas.

Por su parte *Plasmodium* está presente en todas las localidades excepto El Salado, tiene una prevalencia general del 26,9% que va desde 11,1% en Los Helechales hasta 35,3% en La Colorada; mientras que el subgénero *Haemoproteus* se encontró ausente en San Benito y El Salado, con una prevalencia general de 8,6% distribuida entre el 2% en La Colorada y el 30,8% en San Bernardo La Cuchilla. El género *Leucocytozoon* tuvo una prevalencia del 1,9% y se identificó en el 66,7% de las aves con Malaria de El Salado (Figura 3).

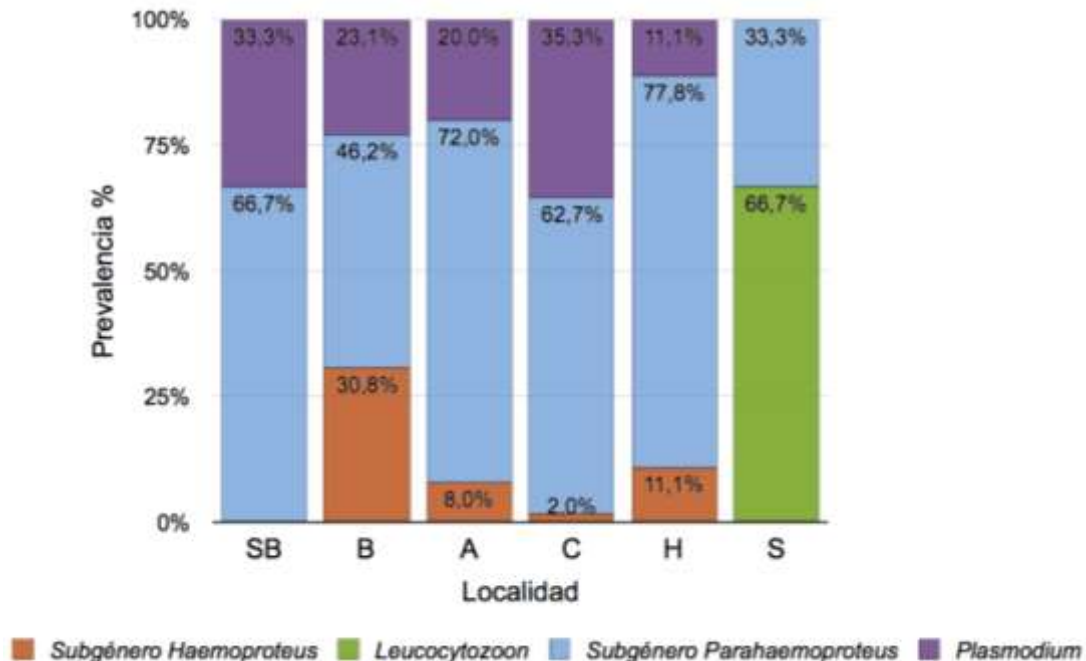


Figura 3. Prevalencia (%) de los géneros de parásitos hemosporidios identificados en las localidades de estudio. SB: San Benito; B: San Bernardo La Cuchilla; A: El Aburrido; C: La Colorada; H: Los Helechales y S: El Salado.

### 3.4. Distribución de linajes

Las secuencias del gen *cyt b* caracterizadas se agruparon en 35 linajes diferentes (Tabla 2), de los cuales nueve corresponden al subgénero *Parahaemoproteus*, 17 a *Plasmodium*, siete al subgénero *Haemoproteus* y dos a *Leucocytozoon*; de los cuales 17 fueron considerados como posibles nuevos linajes (cinco *Parahaemoproteus*, siete *Plasmodium*, cuatro *Haemoproteus* y uno *Leucocytozoon*), y se encuentran en proceso para ser reportados en las bases de datos de GenBank y MalAvi (datos no mostrados).

Tabla 2.

Linaje de hemosporidios encontrados y sus frecuencias. Se listaron las especies hospederas donde fueron encontrados estos linajes y la localidad involucrada, así como el código de los linajes reportados anteriormente en GenBank

Género	Linajes	f (%)	Código en el GenBank	Especie Hospedera (en este estudio)	Localidad (n)	Referencia
Haemoproteus	H.H.2CUA01	1,92	PA	<i>Cathartes aura</i> , <i>Columbina talpacoti</i>	La Cuchilla (2)	Presente trabajo
	H.H.2TME02	0,96	PA	<i>Tyrannus melancholicus</i>	La Cuchilla (1)	Presente trabajo
	H.H.coatneyi-0T551	0,96	KF537285.1	<i>Tangara heinei</i>	El Aburrido (1)	(Gonzalez et al., 2015)
	H.H.COTAL01	0,96	JX029904.1	<i>Columbina talpacoti</i>	La Cuchilla (1)	(Lacorte et al., 2013)
	H.H.DENFU01	0,96	PA	<i>Setophaga fusca</i>	La Colorada (1)	Presente trabajo
	H.H.SCG-2014a	0,96	KJ466076.1	<i>Tangara inornata</i>	Los Helechales (1)	(Galen,S.C. and Witt,C.C. unpublished)
	H.H.TACY02	0,96	PA	<i>Tangara cyanicollis</i>	El Aburrido (1)	Presente trabajo
Parahaemoproteus	H.P.6TAVI06	0,96	PA	<i>Tangara vitriolina</i>	Los Helechales (1)	Presente trabajo
	H.P.3TAVI09	3,84	PA	<i>Tangara vitriolina</i>	El Aburrido (4)	Presente trabajo
	H.P.5TACY01	2,88	PA	<i>Tangara cyanicollis</i>	El Aburrido (2), La Colorada (1)	Presente trabajo
	H.P.H-T002	0,96	JQ988106.1	<i>Zonotrichia capensis</i>	El Aburrido (1)	(Witt,C.C. and McNew,S.M. unpubliseh)
	H.P.H-T028	51	JQ988150.1	<i>Eucometis penicillata</i> , <i>Euphonia laniirostris</i> , <i>Tangara cyanicollis</i> , <i>Tangara guttata</i> , <i>Tangara gyrola</i> , <i>Tangara heinei</i> , <i>Thraupis episcopus</i> , <i>Thraupis palmarum</i>	San Benito (1), La Cuchilla (6), El Aburrido (9), La Colorada (31) y Los Helechales (6)	(Witt,C.C. and McNew,S.M. unpubliseh)
	H.P.H-T112	0,96	JQ988527.1	<i>Pheucticus ludovicianus</i>	El Aburrido (1)	(Witt,C.C. and McNew,S.M. unpubliseh)
	H.P.TAGU03	0,96	PA	<i>Tangara guttata</i>	El Aburrido (1)	Presente trabajo
	H.P.THPA21	0,96	PA	<i>Thraupis palmarum</i>	San Benito (1)	Presente trabajo
	H.P.vireonis-UN193	0,96	KF537320.1	<i>Vireo altiloquus</i>	El Salado (1)	(Gonzalez et al., 2015)

PA: Por asignar. Linajes que estén representados por un código del GenBank, corresponden a la misma secuencia reportada en este.

Género	Linajes	f (%)	Código en el GenBank	Especie Hospedera (en este estudio)	Localidad (n)	Referencia
Plasmodium	P.P04-B	0,96	EU328173.1	<i>Setophaga castanea</i>	San Benito (1)	(Pagenkopp et al., 2008)
	P.OZ45_MEX19	0,96	HM222481.1	<i>Pheucticus ludovicianus</i>	La Colorada (1)	(Ricklefs & Outlaw 2010)
	P.2TIG04	0,96	PA	<i>Turdus ignobilis</i>	La Cuchilla (1)	Presente trabajo
	P.3TUFL01	1,92	PA	<i>Turdus flavipes</i>	El Aburrado (2)	Presente trabajo
	P.5TUIG02	0,96	PA	<i>Turdus ignobilis</i>	La Colorada (1)	Presente trabajo
	P.6ZOCA02	1,92	PA	<i>Zonotrichia capensis</i>	La Colorada (1), Los Helechales (1)	Presente trabajo
	P.7PIRU01	0,96	PA	<i>Piranga rubra</i>	La Colorada (1)	Presente trabajo
	P.BOBO200880	0,96	KC867662.1	<i>Zonotrichia capensis</i>	La Colorada (1)	(Levin et al., 2013)
	P.homopolare-OT597	3,89	KF537287.1	<i>Arremonops conirostris</i> , <i>Icterus chrysater</i> , <i>Zonotrichia capensis</i>	El Aburrado (3), La Colorada (1)	(Gonzalez et al., 2015)
	P.P-T131	0,96	JQ988599.1	<i>Chlorophanes spiza</i>	La Cuchilla (1)	(Witt,C.C. and McNew,S.M. unpubliseh)
	P.RAMCAR01	0,96	KF482346.1	<i>Eucometis penicillata</i>	La Colorada (1)	(Marzal,A., Sehgal,R.N.M. & Cardenas,J.M. unpublished)
	P.STTA28	0,96	JN819336.1	<i>Dacnis hartlaubi</i>	La Colorada (1)	( Archer,H.M. et al., unpublished)
	P.STTA8	0,96	JN819331.1	<i>Tangara vitriolina</i>	La Cuchilla (1)	( Archer,H.M. et al., unpublished)
	P.SWTCH_CA_ELW_13P	4,8	KJ620786.1	<i>Catharus ustulatus</i> , <i>Dacnis lineata</i>	La Colorada (5)	(Trout-Fryxell,R. et al unpublished)
	P.SPTO_CA_ELW_4P	0,96	KJ620777.1	<i>Tangara gyrola</i>	La Colorada (1)	(Trout-Fryxell,R. et al unpublished)
	P.TURIG01	0,96	PA	<i>Turdus ignobilis</i>	La Colorada (1)	Presente trabajo
P.TURIG03	2,88	PA	<i>Turdus flavipes</i> , <i>Turdus ignobilis</i>	La Colorada (3)	Presente trabajo	
Leucocytozoon	L_ZOCAP_07	0,96	KF717054.1	<i>Zonotrichia capensis</i>	El Salado (1)	(Lotta et al., 2016)
	L.DIHU04	0,96	PA	<i>Diglossa humeralis</i>	El Salado (1)	Presente trabajo

PA: Por asignar. Linajes que estén representados por un código del GenBank, corresponden a la misma secuencia reportada en este.

La riqueza de linajes varía entre localidades de tres a 15, siendo La Colorada la localidad con mayor cantidad de linajes diferentes (Tabla 2). El rango de afectación de especies hospederas por parte de los linajes de hemosporidios caracterizados es variable; por ejemplo, el subgénero *Parahaemoproteus* afecta hasta ocho especies diferentes de aves, el subgénero *Haemoproteus* y el género *Plasmodium* afectan hasta tres especies cada uno y cada linaje de *Leucocytozoon* afecta sólo una especie de hospedero.

El linaje H-T028, descrito para el subgénero *Parahaemoproteus*, reportado en Perú en *Tangara viridicollis* a más de 2200 msnm por Witt & McNew (no publicado, según NCBI), fue el linaje más frecuente (51%), se encontró en la mayoría de las localidades (excepto El Salado) y es el que más afecta a diferentes especies de aves hospederas (8) (Tabla 2). Los resultados también denotan que, el número de linajes de parásitos presentes en alguna especie de ave varía entre 1 y 5, siendo *Zonotrichia capensis* la especie afectada por la mayor cantidad (5) seguida de *Turdus ignobilis* (Tabla 2).

### 3.5. Composición de linajes de hemosporidios y especies de aves

Al realizar el análisis de la composición a partir del escalamiento multidimensional (NMDS), tanto de linajes de parásitos como de especies de Aves, para cada localidad se tuvo en cuenta las diferentes salidas de campo realizadas. Estas variaron en número de dos a cinco por localidad (Anexo 2).

Teniendo en cuenta lo anterior y para la composición de linajes de parásitos, el NMDS mostró un agrupamiento por similitud de las localidades San Benito, San Bernardo La Chuchilla y El Aburrado con Los Helechales; a su vez este agrupamiento presenta diferencias con La

Colorada debido a que en la quinta salida de campo se encontró un linaje del género *Plasmodium* (P.STTA28), presente sólo en esta localidad. También se detectaron diferencias con El Salado (Figura 4A), debido a que en la primera salida a esta localidad se encontraron exclusivamente muestras del género *Leucocytozoon* (Anexo 2).

En cuanto al análisis de composición de especies de aves, el NMDS evidenció un agrupamiento de todas las localidades incluido El Salado. Este agrupamiento presenta diferencias con la composición hallada en la tercera salida de campo realizada en San Benito (Figura 4B).

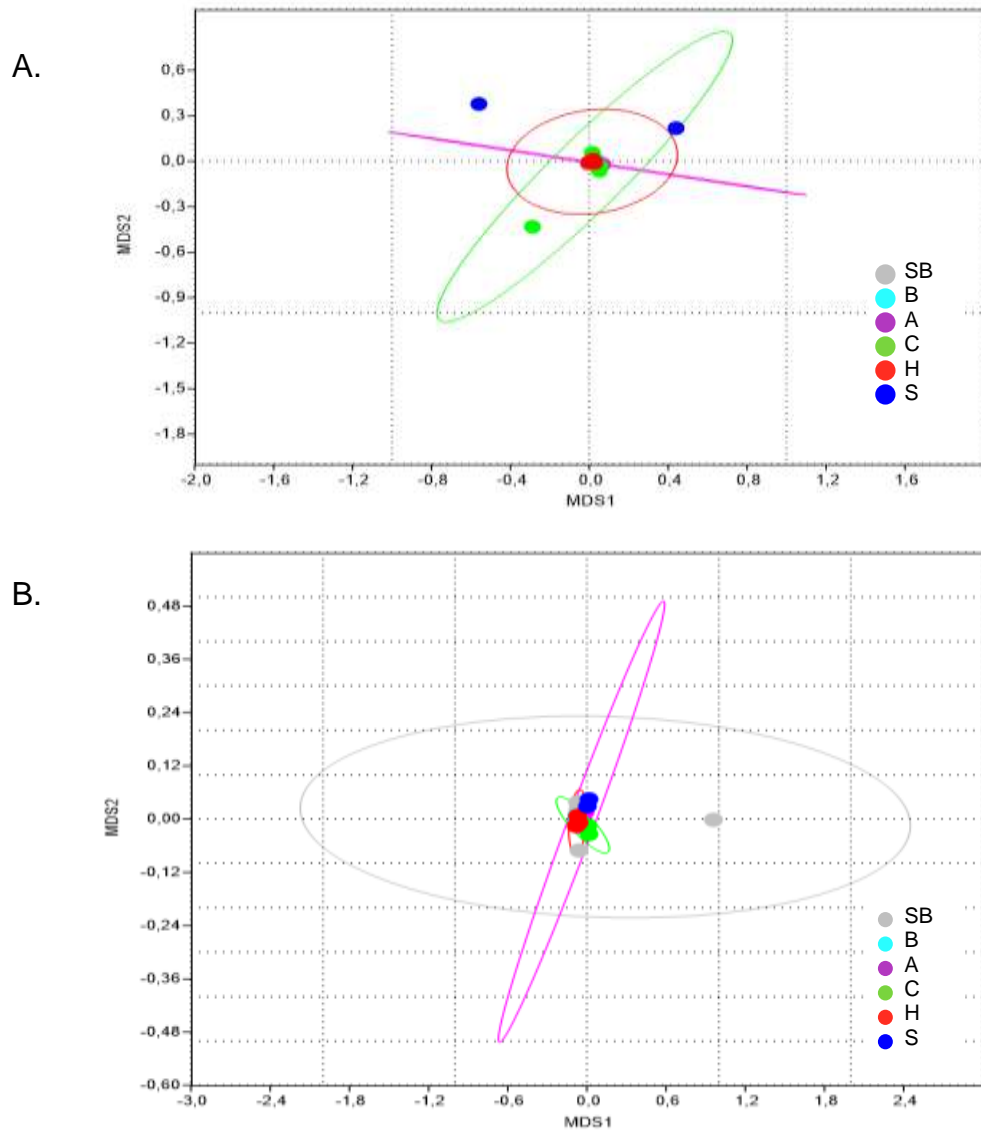


Figura 4. Composición de linajes de parásitos hemosporidios y especies de aves obtenidos con análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). Se representan los espacios de ordenación del NMDS de los linajes de parásitos (A) y las especies de aves (B) por localidad de muestreo. SB: San Benito; B: San Bernardo La Cuchilla; A: El Aburrido; C: La Colorada; H: Los Helechales y S: El Salado.

Al evaluar la hipótesis uno, (SBvsBvsAvsCvsHvsS), el ANOSIM mostró que no existen diferencias significativas entre la composición de linajes de hemoparásitos en las localidades de estudio (Tabla 3A). Sin embargo, se observaron diferencias significativas al evaluar las hipótesis

donde se compararon La Colorada vs las demás localidades ( $p=0,0369$ ) y El Salado vs las demás localidades ( $p=0,0173$ ) (Tabla 3B).

Tabla 3.

*Análisis de similaridad ANOSIM de la composición de linajes de parásitos hemosporidios y especies de Aves en las localidades de estudio. A. Evaluación de la hipótesis uno. B. Evaluación de las hipótesis dos a siete.*

A.

<b>Hipótesis 1: SB vs B vs A vs C vs H vs S</b>						
<b>Localidad</b>	<b>SB</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>S</b>
<b>SB</b>	-	0,3292	0,5021	0,5014	0,3992	1
<b>B</b>	0,6646	-	0,5012	0,5643	0,4703	0,3313
<b>A</b>	0,3002	0,2039	-	0,4623	0,5649	0,0955
<b>C</b>	0,1269	0,2344	0,2128	-	0,3907	0,2828
<b>H</b>	0,1226	0,6588	0,0874	0,1966	-	0,1941
<b>S</b>	0,0951	0,3311	0,1068	<b>0,0489</b>	0,0656	-

B.

<b>Hipótesis</b>	<b>Parásitos</b>	<b>Aves</b>
<b>2: SB vs B+A+C+H+S</b>	0,3515	<b>0,0246</b>
<b>3: B vs SB+A+C+H+S</b>	0,8064	0,8019
<b>4: A vs SB+B+C+H+S</b>	0,6744	0,7555
<b>5: C vs SB+B+A+H+S</b>	<b>0,0369</b>	0,4079
<b>6: H vs SB+B+A+C+S</b>	0,74	0,8943
<b>7: S vs SB+B+A+C+H</b>	<b>0,0173</b>	<b>0,0295</b>

En todos los casos las diferencias significativas ( $p<0,05$ ) están resaltadas. Para la hipótesis uno, por encima de la diagonal valores  $p$  de la composición de linajes de parásitos hemosporidios y debajo de la diagonal valores  $p$  de la composición de especies de Aves.

Con respecto a la composición de Aves, el ANOSIM evidenció diferencias significativas entre: La Colorada y El Salado en la evaluación de la hipótesis uno ( $p=0,0489$ ) (Tabla 3A); San

Benito vs las demás localidades, al evaluar la hipótesis 2 ( $p=0,0246$ ) y El Salado vs las demás localidades al evaluar la hipótesis 7 ( $p=0,0295$ ) (Tabla 3B).

La curva de rarefacción reveló que la riqueza de parásitos hemosporidios aumenta hasta los 1264msnm (La Colorada) y entre 1309msnm (Los Helechales) y 3417msnm (El Salado) disminuye (Figura 5a). Este patrón es disímil con el de la riqueza de especies de Aves, el cual exhibe un incremento entre los 1132 y 1264msnm (El Aburrado y La Colorada), mientras en las demás altitudes se presenta disminución de la misma (Figura 5b).

Se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman, donde se observaron valores de Rho ( $Rho= 0,231$ ,  $p=0,658$ ) que evidencian que no existe una correlación entre las variables de riqueza de parásitos y de riqueza de aves de cada localidad.

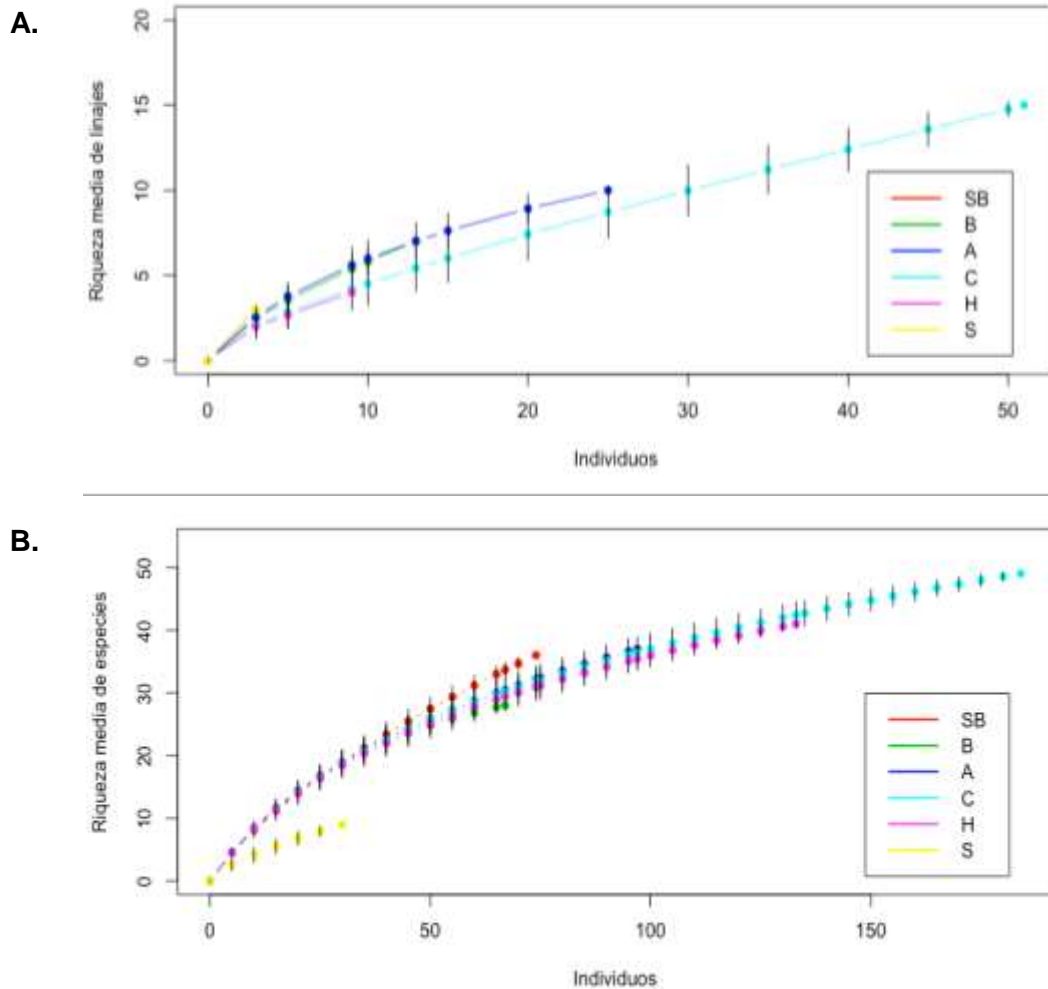


Figura 5. Curva de rarefacción, riqueza en las seis localidades de estudio. A. linajes de parásitos hemosporidios; B. especies de Aves encontradas. SB: San Benito, B: San Bernardo La Cuchila, A: El Aburrado, C: La Colorada, H: Los Helechales, S: El Salado.

#### 4. Discusión

Este estudio realiza la primera caracterización de parásitos causantes de malaria mediante el uso de técnicas moleculares, en comunidades de aves silvestres de seis localidades del departamento de Santander, las cuales constituyen un gradiente altitudinal comprendido entre 902msnm y

3417msnm, además de estimar la prevalencia de la enfermedad. Los resultados obtenidos brindan aportes relacionados con la ecología de la interacción parásito-hospedero de Aves presentes en Santander, tales como la falta de relación entre la riqueza de especies de aves y la riqueza de linajes de parásitos, entre otros.

#### **4.1. Técnicas de identificación de parásitos hemosporidios**

Diferentes estudios realizados en Colombia se han enfocado en la evaluación de infección por Malaria aviar (Rodriguez et al., 2009), la descripción de nuevas especies de hemosporidios aviarios (Matta et al., 2014; Lotta et al., 2015) y las relaciones filéticas de estos parásitos (Mantilla et al., 2013a; Mantilla et al., 2013b; Walther et al., 2014; Matta et al., 2014; Gonzalez et al., 2015; Lotta et al., 2015; Gonzalez-Quevedo et al., 2016).

En la detección de los hemoparásitos, se han implementado técnicas de microscopía que permiten realizar descripciones morfológicas (Beneth & Borrero, 1976; Rodriguez & Matta, 2001; Valkiunas et al., 2003; Matta et al., 2004; Basto et al., 2006; Rodriguez et al., 2009; Gonzalez et al., 2014) y técnicas moleculares basadas en PCR, principalmente, que han permitido la identificación de nuevos linajes o haplotipos de hemosporidios aviares (Lotta, 2010; Lotta et al., 2013; Mantilla et al., 2013a), además de la estimación de la prevalencia de los mismos (Mantilla et al., 2013b; Walther et al., 2014; Matta et al., 2014; Gonzalez et al., 2015; Lotta et al., 2015; Gonzalez-Quevedo et al., 2016).

Ricklefs et al., (2005) y Mantilla et al., (2013b) plantearon que la identificación morfológica de hemosporidios aviares como única herramienta, genera sesgos a la hora de detectar la infección de los parásitos causantes de Malaria Aviar, dado que se obtienen valores de

prevalencia menores a los que se alcanzan cuando se utilizan técnicas basadas en biología molecular, debido a que la infección puede ocurrir en una intensidad difícil de detectar con la exploración visual.

Lo anterior constituye una justificación del uso de técnicas basadas en PCR en la detección de linajes y la estimación de la prevalencia de infección de Malaria en poblaciones de Aves, dado que estas técnicas se consideran sensibles, específicas y efectivas, además los resultados se obtienen en menor tiempo y suelen ser confiables cuando se presentan infecciones a bajas intensidades (Richard et al., 2002, Ishtiaq et al., 2017).

Estudios donde se implementó el uso de técnicas de microscopía (Beneth & Borrero, 1976; Rodriguez & Matta, 2001; Valkiūnas et al., 2003; Matta et al., 2004 y González et al., 2014), estimaron valores de prevalencia de Malaria Aviar inferiores a lo hallado en esta investigación (24%). Precisamente, este valor es muy similar al reportado por Lotta et al., (2010) (22,3%) y supera lo reportado por González et al., (2015) (10%), quienes usaron técnicas moleculares en muestras de Aves en algunas zonas de Colombia.

Diferentes estudios que utilizaron microscopía (Rodriguez et al., 2009; Gonzalez et al., 2014), PCR (Lotta, 2010; González et al., 2015; Lotta et al., 2015; Gonzalez-Quevedo et al., 2016) o una combinación de las dos estrategias (González et al., 2015), reportan frecuencias de infección inferiores al 46%, valor detectado cuando se siguió el protocolo descrito por Fallon et al., (2003) en esta investigación. Esta frecuencia de infección es comparable con los estudios realizados por Latta & Ricklefs (2010), quienes estimaron el 44,3% de infección en República Dominicana; Belo et al., (2011), quienes reportaron el 49% de infección en 676 muestras diferentes de Aves en Brasil, resultados que contrastan con lo hallado por Lacorte et al., (2013), quienes registraron una frecuencia de infección del 35,3% también en Aves de Brasil.

Lo anterior muestra que los estudios que utilizan técnicas moleculares pueden evidenciar un aumento en la detección de la infección, así como en la estimación de la prevalencia (Fallon et al., 2003, Ishtiaq et al., 2017), en este caso se identificaron tres géneros de hemosporidios, a saber *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucocytozoon*. Autores como Hellgren et al., (2004), Ricklefs et al., (2005) y Lacorte et al., (2013) destacan que el uso de múltiples cebadores es útil al evaluar la infección por parásitos hemosporidios, asimismo, la implementación de la PCR anidada para la obtención de secuencias del gen *cyt b*, ha permitido realizar estimaciones e identificaciones más robustas de la presencia de dichos parásitos, tanto en Colombia como en el resto del mundo y, contribuye con la identificación de distintos linajes revelando un mayor número de los mismos, como se evidencia en el presente trabajo con la identificación de 35 linajes diferentes.

#### **4.2. Prevalencia de infección de acuerdo con las localidades y especies de aves analizadas**

En el presente estudio la frecuencia de infección por Malaria varió entre familias de aves, siendo Thraupidae y Turdidae las más susceptibles a ser infectadas, resultado que contrasta con lo hallado en otros estudios realizados en Colombia, donde las familias con mayor prevalencia de infección son Vireonidae (Rodríguez & Matta, 2001), Emberizidae (Walther et al., 2014; Gonzalez-Quevedo et al., 2016) y Tyrannidae (Londoño et al., 2007). Precisamente, White et al., (1978) reportaron que tanto Thraupidae, como Turdidae son familias que pueden presentar aspectos del comportamiento y condiciones fisiológicas o genéticas que las hacen tener una mayor probabilidad de entrar en contacto y verse afectadas por los vectores que transmiten la enfermedad.

Las especies de Thraupidae y Turdidae abarcan distintos hábitats, distribuyéndose en todas las localidades contempladas en el estudio, lo que posibilita que entren en contacto con distintos vectores; adicionalmente, al Thraupidae presentar la mayor riqueza de especies, esta familia proporciona un elevado número de hospederos que podrían verse afectados por diferentes vectores, hecho que puede influenciar la alta prevalencia de hemosporidios en las muestras estudiadas de esta familia (Ricklefs et al., 2014, Elis et al., 2016).

Se resalta el hecho que el 61,5% de las especies de Thraupidae se encontraron infectadas por el subgénero *Parahaemoproteus*. Lo anterior puede ser indicador que esta familia de Aves está siendo afectada, principalmente, por vectores Dípteros de las familias Hippoboscidae y Ceratopogonidae (Atkinson et al., 2008; Belo, 2011; Bazán-Quijada, 2014); estos se estarían distribuyendo en todas las localidades contempladas y probablemente se encuentren desarrollando un ciclo de transmisión local (Valkiunas, 2005), el cual se desconoce, lo que puede estar aumentando su presencia en las muestras estudiadas, además de incidir en la dinámica de transmisión de los parásitos.

La alta prevalencia detectada del género *Haemoproteus* (52,4%) concuerda con lo reportado en estudios realizados en Colombia (Beneth & Borrero, 1976; Rodriguez & Matta, 2001; Gonzalez et al., 2014; Gonzalez et al., 2015) y Perú (Jones et al., 2013). Este resultado aporta a la idea que el género *Haemoproteus* constituye una ocurrencia predominante en relación a *Plasmodium*, idea sustentada en el número de trabajos realizados con muestras de Colombia donde se verifica esta particularidad. Una observación análoga se aprecia en la ocurrencia predominante de *Plasmodium* en relación con *Haemoproteus* en muestras estudiadas en Aves de Brasil (Lacorte et al., 2013; Clark et al., 2014). Por su parte, el género *Leucocytozoon* se encontró solo en el 1,9% de las muestras estudiadas, siendo el menos prevalente. Este resultado

concuera con la hipótesis planteada por Lotta (2010), la cual indica que para el Neotrópico existe una baja disponibilidad de vectores que transmiten y mantienen el ciclo de vida de este género de hemoparásito aviar.

Los vectores que transmiten al género *Leucocytozoon* pertenecen a la familia Simuliidae (Santiago-Alarcon et al., 2012). Rodriguez et al., (2009) indican que los simulidos requieren de corrientes de agua oxigenada para completar su ciclo de vida, las cuales son comunes en zonas montañosas, especialmente en ecosistemas de páramo (Zahar, 1951). Este hecho brinda sustento a lo obtenido en la presente investigación, ya que *Leucocytozoon* se encontró únicamente en El Salado (3417msnm), localidad ubicada en el Páramo de Santurbán en la que fluyen dos riachuelos con corriente (obs. per).

Rodriguez et al., (2009) reportaron a 3206msnm, una prevalencia del 21,3% de *Leucocytozoon* en el Parque Nacional Natural Chingaza; mientras que González-Quevedo et al., (2016) reportaron en la Sierra Nevada de Santa Marta, una prevalencia de 58,8% de este género a 1640 y 2100msnm. Dado el hecho de la presencia de *Leucocytozoon* en especies residentes y de baja movilidad de la localidad El Salado, indica que los vectores de este género se encuentran comenzando a establecer un ciclo de transmisión local (Valkiunas, 2005, Levin et al., 2013) en el área, razón que permite explicar el bajo valor de prevalencia de este parásito.

El género *Plasmodium* no se distribuyó en El Salado. Según Mantilla et al., (2013b) las bajas temperaturas pueden causar un efecto negativo en el ciclo de vida de Culicidae, su principal vector. Pese a esto, se ha planteado que es posible la transmisión de parásitos de este género, en zonas altas como consecuencia del cambio climático (Zamora-Vilchis et al. 2012; Mantilla et al., 2013b), lo cual no desvirtúa el hecho que este hemoparásito sea detectado si se muestrean zonas por encima de 2000msnm en el departamento de Santander.

La influencia del cambio climático en aspectos como la intensidad y periodicidad de las precipitaciones, el incremento o disminución de la temperatura ambiental, así como la influencia antropogénica evidenciada en la expansión de cultivos, zonas de pastoreo y ganadería y la degradación de hábitats (común entre las localidades contempladas en esta investigación), pueden ser factores importantes que pueden alterar las relaciones parásito-hospedero incrementando la prevalencia de los hemosporidios aviarios, lo que genera efectos negativos en las poblaciones y comunidades de aves (Deem et al., 2001, Gonzalez-Quevedo et al., 2014, Hernández-Lara et al., 2017). A la luz de lo planteado, precisamente, las localidades muestreadas que presentan algún grado de intervención, son las que registran mayor prevalencia de infección por parásitos hemosporidios.

Por otra parte, con una prevalencia de 0,96%, este estudio constituye el primer reporte de infección por parásitos causantes de Malaria en *Dacnis hartlaubi* (Thraupidae) especie endémica de Colombia (Hilty & Brown 1996; Stiles 1998). Esta especie se encuentra catalogada como vulnerable C2a(I) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (BirdLife International, 2016). Gonzalez-Quevedo et al., (2016), reportaron infección por Malaria en *Atlapetes melanocephalus*, *Arremon basilicus* (Emberizidae) y *Myioborus flavivertex* (Parulidae), especies endémicas que se encuentran catalogadas con grado de amenaza menor, debido al bajo conocimiento sobre sus poblaciones (BirdLife International, 2016). Lo anterior constituye evidencia que la infección por Malaria Aviar, puede ser considerada como un factor de riesgo en la pérdida de especies endémicas (Gonzalez-Quevedo et al., 2016).

### 4.3. Distribución de linajes

Las secuencias del gen *cyt b* caracterizadas (104) evidencian una diversidad de linajes similar a otros estudios realizados en Colombia (González et al., 2015; Gonzalez-Quevedo et al., 2016), la cual contrasta con lo reportado por los estudios de Belo et al., (2011) y Lacorte et al., (2013) hechos en Brasil y con lo reportado por Fecchio et al., (2017a) en Panamá, Brasil, Ecuador y Perú.

De los 35 linajes encontrados, se aportan 17 posibles nuevos linajes que podrán ser útiles en posteriores estudios de genética poblacional, sistemática filogenética, filogeografía y/o evolución, orientados a corroborar, soportar y/o establecer el origen de los mismos. Estos estudios permitirán responder preguntas que relacionen la presencia de nuevos linajes con la ampliación del rango de hospederos por parte de los mismos, lo cual es un factor clave para la especiación de estos parásitos (Gonzalez-Quevedo et al., 2016).

La alta frecuencia obtenida del linaje H-T028 (51%) y su presencia en la mayoría de las localidades, indica que este se transmite exitosamente por sus vectores y, probablemente, estos se encuentran distribuidos en todo el gradiente altitudinal estudiado, excepto la localidad a 3417msnm. Este linaje es muy frecuente en aves de la familia *Thraupidae* (98,1%) y una secuencia (1,8%) fue detectada en aves de la familia *Fringilidae* presentes en La Colorada. El hecho que el linaje H-T028 afecte principalmente a *Thraupidae*, puede ser un indicador que sea especialista para esta familia y es posible que esté empezando a ocupar otros tipos de hospederos (Ricklefs et al., 2014).

En cuanto a las aves migratorias estudiadas, se observaron linajes exclusivos de hemoparásitos en estas, por ejemplo, el linaje de *Haemoproteus* (Subgénero *Parahaemoproteus*)

*vireonis* (KF537320.1), hallado en *Vireo altiloquus*, y reportado en Estados Unidos (Perkins, 2008), Brasil (Fecchio et al., 2017b) y Colombia (González et al., 2015); así como los linajes del subgénero *Parahaemoproteus* sp. (JQ988527.1) reportado en Perú (Witt & McNew., artículo no publicado) y el género *Plasmodium* sp. (HM222481.1) reportado en las Bahamas y Antillas (Ricklefs & Outlaw 2010), ambos caracterizados en *Pheucticus ludovicianus*. De igual forma se encontró un linaje del género *Plasmodium* (EU328173) en *Setophaga castanea* reportado en Estados Unidos (Pagenkopp et al., 2008).

Todos los linajes nombrados anteriormente no se encontraron en aves residentes, lo que estaría indicando que la infección probablemente no fue adquirida en las localidades de estudio y esos linajes aún no se han establecido en las mismas. Gonzalez et al., (2015) afirman que factores como la presencia de vectores, las diferencias en la diversidad de aves, la compatibilidad parasito-hospedero y vector-parásito y la baja intensidad de infección, impiden el establecimiento de este tipo de linajes en zonas diferentes a las antes reportadas para estos. Por otra parte, el linaje que afectó a la especie migratoria *Catharus ustulatus* (KJ620786.1, reportado para Estados Unidos) se encontró en una especie residente (*Dacnis lineata*); este resultado puede indicar que posiblemente dicho linaje está establecido en la zona de estudio (La Colorada, Tabla 2) hecho que debe ser corroborado con estudios que identifiquen los vectores que transmiten la enfermedad en dicha localidad, dada la gran importancia que pueden tener para el entendimiento del ciclo de transmisión de los parásitos hemosporidios (Schmid et al., 2017).

#### 4.4. Composición de linajes de hemoparásitos y de especies de aves

La composición tanto de especies de aves cómo de linajes de parásitos fue similar a lo largo del gradiente altitudinal, presentando diferencias entre El Salado y las demás localidades (Tabla 3B). El Salado, como ya se hizo mención, hace parte del páramo de Santurbán, es una zona que presenta fragmentos de bosque altoandino y limita con áreas de páramo azonal (Medina et al., 2015), mientras que las otras cinco localidades se caracterizan por presentar sistemas agroforestales como cultivos y zonas de ganadería extensiva (Donegan et al., 2010). Lo anterior permite hipotetizar que, las diferencias entre ecosistemas pueden estar asociadas a las diferencias en la composición de linajes de parásitos y de especies de Aves.

Por otra parte, la ausencia de correlación entre la riqueza de aves y la riqueza de linajes de parásitos entre las localidades de estudio, se asemeja a lo reportado por Ellis et al., (2016), quienes usando un modelo generalizado de efecto mezclado binomial lineal (GLME), encontraron que no existe relación entre la presencia de parásitos y la abundancia de aves hospedadas entre los sitios estudiados por ellos. Esta falta de correlación indica que la presencia de diferentes linajes de hemosporidios en las localidades contempladas, puede estar siendo influenciada por otros factores cómo la riqueza de vectores (Gonzalez et al., 2015), y/o variables ambientales como temperatura y humedad relativa, que pueden afectar la presencia de parásitos en el área (Hernández-Lara et al., 2017).

Con el fin de observar si los muestreos diferenciales en las áreas de estudio están influenciando la existencia de una correlación entre la riqueza de aves y la riqueza de parásitos observada, se realizó un análisis de la correlación con los datos de riqueza de aves y linajes de parásitos totales (sin tener en cuenta la curva de rarefacción). Los resultados muestran que el

66% de la riqueza de Aves influencia la riqueza de parásitos ( $Rho=0,66$ ;  $p=0,15$ ). El hecho que el valor de  $p$  no es significativo, indica que la posible correlación parásito-hospedero está siendo sesgada por los muestreos diferenciales realizados para cada zona, siendo El Salado la localidad que presentó menor riqueza y en la que se presentó menor intensidad de muestreo; asimismo, al excluir esta localidad del análisis de correlación, se corroboró que la riqueza de aves no influye sobre la riqueza de parásitos.

## 5. Conclusiones

A partir de la obtención de secuencias cyt b de parásitos hemosporidios presentes en muestras sanguíneas de 104 individuos de distintas especies de Aves estudiadas en seis localidades del departamento de Santander, se concluye que:

\* La prevalencia de malaria aviar en las localidades consideradas fue del 24,1%, valor comparable con el estimado en otros estudios realizados en Colombia, el cual indica la importancia que tiene la afectación de esta enfermedad infecciosa en las poblaciones silvestres de Aves presentes en Santander.

\* El 48,5% de los 35 linajes de hemosporidios aviarios identificados, son posibles linajes nuevos de *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucocytozoon*. La presencia de estos linajes indica que, las comunidades de aves y las localidades estudiadas tienen singularidades que favorecen el establecimiento de estos hemoparásitos en el área de estudio.

\* El linaje H-T028 se detectó en el 51% de las muestras secuenciadas y afecta principalmente las especies de la familia Thraupidae. Este hecho permite inferir que dicho hemosporidio se ha especializado en esta familia de Passeriformes.

\* La riqueza de aves no influye sobre la riqueza de parásitos en las localidades consideradas; sin embargo el hecho que puedan existir singularidades debido a la presencia de nuevos linajes de hemosporidios, revela la necesidad de realizar posteriores investigaciones que profundicen en la ecología de la interacción y en la posible relación evolutiva entre los parásitos y sus hospederos en el departamento de Santander.

## 6. Recomendaciones

Para estudios posteriores que se realicen en el departamento de Santander, se recomienda:

\* Incluir en el muestreo a Aves de la familia Trochilidae, dado que investigaciones realizadas en otras localidades de Colombia han evidenciado que la prevalencia de malaria aviar en esta familia es importante, especialmente en zonas elevadas.

\* Ampliar el muestreo para la búsqueda e identificación de linajes de hemosporidios, y por tanto la estimación de la prevalencia de malaria, en Aves que coexistan en ecosistemas de bosque seco y en los sistemas de ciénagas del valle medio del río Magdalena.

\* Dado que el estudio de las variables ambientales es de gran importancia para el entendimiento de las relaciones vector-parásito-hospedero, se recomienda realizar estudios de la relación parasito-vector y parásito-hospedero en los cuales se incluyan variables como temperatura, humedad relativa y precipitación, entre otras, las cuales pueden responder preguntas relacionadas con la influencia de la diversidad de linajes de parásitos, así como la intensidad de infección en las aves.

\*Conducir un estudio que incluya a los posibles vectores que transmiten la enfermedad, con el fin de establecer la dinámica de transmisión de los parásitos hemosporidios en el departamento y en Colombia, debido a la falta de información sobre los mismos en el país.

\* El estudio de los estadios morfológicos de los parásitos que se encuentran afectando a las Aves por malaria en el departamento, con el fin de aportar nuevos conocimientos acerca de estos individuos.

### Referencias Bibliográficas

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215 (3): 403 - 410.
- Atkinson, C. T., van Riper, C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. *Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour*, 19-48.
- Atkinson, C. T., Dusek, R. J., Woods, K. L., Iko, W. M. 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* 36 (2): 197–201.
- Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, B.D. 2008. Parasitic Diseases of Wild Birds.
- Atkinson, C. T., LaPointe, D, A. 2009. Introduced Avian Diseases, Climate Change, and the Future of Hawaiian Honeycreepers. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 23 (1): 53–63.
- Basto, N., Rodríguez, O. A., Marinkelle, O. J., Gutierrez, R., Matta, N. E. 2006. Haematozoa in birds from La Macarena National Natural Park (Colombia). *Caldasia* 28 (2): 371-377.
- Bazán-Quijada, A. 2014. Detección de hemoparásitos en sangre de aves.
- Belo, N. O. 2011. Prevalência e diversidade de Haemosporida em aves silvestres de diferentes habitats no Brasil e na Venezuela.
- Belo, N. O., Pinheiro, R. T., Reis, E S., Ricklefs, R E., Braga, É. M. 2011. Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. Editado por Sharon Gursky-Doyen. *PLoS ONE* 6 (3): e17654.

- Bennett, G. F., Borrero H. J. I. 1976. Blood parasites of some birds from Colombia. *Journal of Wildlife Diseases* 12 (3): 454 - 458.
- Bennett, G. F., Montgomerie, R., Seutin, G. 1992. Scarcity of Haematozoa in Birds Breeding on the Arctic Tundra of North America. *The Condor* 94 (1): 289 - 292.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., Pinheiro, R. T. 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.
- 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.
- BirdLife International. 2016. *Dacnis hartlaubi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22722969A94795824. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22722969A94795824.en>. Descargado el 27 de marzo de 2017.
- Braga, É. M., Silveira, P., Belo, N. O., Valkiūnas, G. 2011. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of Plasmodium spp in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 3–11.
- Cadena-Ortiz. 2015. Malaria Aviar en los Chingolos (*Zonotrichia capensis*) del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador. *Apunts. Medicina de l'esport* 41 (149): 7–14.
- Campos, D.N. 2012. Efeitos das alterações ambientais sobre a saúde de aves silvestres utilizando hemoparasitos como indicadores. (Doctoral dissertation, Universidad federal de minas gerais).
- Clark, N. J., Clegg, M. S., Lima, M. R. 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.
- Deem, S. L., Karesh, W. B., & Weisman, W. 2001. Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation biology*, 15(5), 1224-1233.

- Donegan, T. M., Avendaño, J. E., Briceño-L, E. R., Luna, J. C., Roa, C., Parra, R., Turner, C., Sharp, M., Huertas, B. 2010. Aves de la Serranía de los Yariguíes y tierras bajas circundantes, Santander, Colombia. *Cotinga* 32: 72–89.
- Ellis, V. A., Medeiros, M. C., Collins, M. D., Sari, E. H., Coffey, E. D., Dickerson, R. C., Lugarini, C., Stratford, J. A., Henry, D. R., Merrill, L., Matthews, A. E., Hanson, A. A., Roberts, J. R., Joyce, M., Kunkel, M. R., Ricklefs, R. E. 2016. Prevalence of avian haemosporidian parasites is positively related to the abundance of host species at multiple sites within a region. *Parasitology Research*, 116(1), 73-80.
- 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.
- Fecchio, A., Svensson-Coelho, M., Bell, J., Ellis, V. A., Medeiros, M. C., Trisos, C. H., Blake, J. G., Loiselle, B. A., Tobias, J. A., Fanti, R., Coffey, E. D., De Faria, I. P., Pinho, J. B., Felix, G., Braga, E. M., Anciães, M., Tkach, V., Bates, J., Witt, C., Weckstein, J. D., Ricklefs, R. E., Farias, I. P., 2017a. Host associations and turnover of haemosporidian parasites in manakins (Aves: Pipridae). *Parasitology*, 1-10.
- Fecchio, A., Pinheiro, R., Felix, G., Faria, I. P., Pinho, J. B., Lacorte, G. A., Braga, E. M., Farias, I. P., Aleixo, A., Tkach, V. V., Collins, M. D., Bell, J. A., Weckstein, J. D. 2017b. Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. *Ecography*.
- Feldman, R. A., Freed, L. A., Cann, R. L. 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology*, 4(6), 663-674.
- Garamszegi, L. Z. 2010. Climate Change Increases the Risk of Malaria in Birds: climate change and malaria prevalence. *Global Change Biology* 17 (5): 1751-1759.
- Garnham, P. C. C. 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*.
- González, A. D., Matta, N. E., Ellis, V.A., Miller, E.T., Ricklefs, R. E., Gutiérrez, H. R. 2014. Mixed Species Flock, Nest Height, and Elevation Partially Explain Avian Haemoparasite Prevalence in Colombia. Editado por Érika Martins Braga. *PLoS ONE* 9 (6): e100695.

- 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. *Parasitology International* 64 (4): 48–59.
- Gonzalez-Quevedo, C., Davies, R. G., Richardson, D. S. 2014. Predictors of malaria infection in a wild bird population: landscape-level analyses reveal climatic and anthropogenic factors. *Journal of animal ecology*, 83(5), 1091-1102.
- 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).
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. 2009. PAST-PALaeontological STatistics, ver. 1.89. *University of Oslo, Oslo*, 1-31.
- 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.
- 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.
- 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 related blood parasites. *Ecology* 90 (10): 2840–2849.
- Heracle BioSoft. 2013. DNA Sequence Assembler v4, [online] [www.DnaBaser.com](http://www.DnaBaser.com).
- 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.
- Hilty, S. L., Brown, B. 1986. *A guide to the birds of Colombia*. Princeton University Press.

- Huff, C. G. 1965. Susceptibility of mosquitoes to avian malaria. *Experimental parasitology* 16 (1): 107–132.
- Ishtiaq, F., Rao, M., Huang, X., Bensch, S. 2017. Estimating prevalence of avian haemosporidians in natural populations: a comparative study on screening protocols. *Parasites & Vectors*, 10(1), 127.
- Jarvi, S. I., Schultz, J. J., Atkinson, C. T. 2002. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *Journal of Parasitology* 88 (1): 153–158.
- Jones, M. R., Cheviron, Z. A., Carling, M. D. 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.
- Knowles, S. C. L., Wood, M. J., Sheldon, B. C. 2010. Context-Dependent Effects of Parental Effort on Malaria Infection in a Wild Bird Population, and Their Role in Reproductive Trade-Offs. *Oecologia* 164 (1): 87–97.
- Latta, S. C., Ricklefs, R. E. 2010. Prevalence patterns of avian haemosporida on Hispaniola. *Journal of Avian Biology*, 41(1), 25-33.
- Lacorte, G. A., Félix, G. M. F., Pinheiro, R. R. B., Chaves, A. V., Almeida-Neto, G., Neves, F. S., Leite, L. O., Santos, F. R., Braga, É. M. 2013. Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites A Molecular Survey from Southeast Brazil. Editado por Georges Snounou. *PLoS ONE* 8 (3): e57770.
- LaPointe, D. A., Atkinson, C. T., Samuel, M. D. 2012. Ecology and Conservation Biology of Avian Malaria: Ecology of Avian Malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1249 (1): 211–226.
- LaPointe, D. A., Lee Goff, M., Atkinson, C. T. 2010. Thermal Constraints to the Sporogonic Development and Altitudinal Distribution of Avian Malaria *Plasmodium Relictum* in Hawaii. *Journal of Parasitology* 96 (2): 318–324.
- Levin, I. I., Zwiars, P., Deem, S. L., Geest, E. A., Higashiguchi, J. M., Iezhova, T. A., Jiménez-Uzcátegui, G., Kim, D. H., Morton, J. P., Perlut, N. G., Renfrew, R. B., Sari, E. H. R.,

- Valkiunas, G., Parker, P. G. 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.
- Londoño, A., Pulgarin-R, P. C., Blair, S. 2007. Blood Parasites in Birds From the Lowlands of Northern Colombia. *Caribbean Journal of Science* 43 (1): 87–93.
- Lotta, I. A., Matta, N. E., Moncada, L. I. 2010. Presencia de simúlidos ornitofílicos en el Parque Nacional Natural (PNN) Chingaza: implicaciones en la transmisión del hemoparásito *Leucocytozoon sp.* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Lotta, I. A., Matta, N. E., Torres, R. D., Moreno-de Sandino, M., Moncada, L. I. 2013. *Leucocytozoon Fringillinarum* and *Leucocytozoon Dubreuilii* in *Turdus Fuscater* from a Colombian Páramo Ecosystem. *Journal of Parasitology* 99 (2): 359–362.
- Lotta, I. A., Gonzalez, A. D., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., Valkiūnas, G., Moncada, L. I., Matta, N. E. 2015. *Leucocytozoon Pterotenuis* Sp. Nov. (Haemosporida, Leucocytozoidae): Description of the Morphologically Unique Species from the Grallariidae Birds, with Remarks on the Distribution of *Leucocytozoon* Parasites in the Neotropics. *Parasitology Research* 114 (3): 1031–1044.
- Lotta, I. A., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., González, A. D., Mantilla, J. S., Moncada, L. I., Adler, P. H., Matta, N. E. 2016. *Leucocytozoon* Diversity and Possible Vectors in the Neotropical Highlands of Colombia. *Protist* 167 (2): 185–204.
- Mantilla, J. S., Matta, N. E., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., González, A. D., Moncada, L. I. 2013a. Identification of *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *lutzi* (Lucena, 1939) from *Turdus fuscater* (great thrush) in Colombia. *The Journal of parasitology*, 99(4), 662-668.
- Mantilla, J. S., González, A. D., Valkiūnas, G., Moncada, L. I., & Matta, N. E. 2013b. Description and molecular characterization of *Plasmodium* (*Novyella*) *unalis* sp. nov. from the Great Thrush (*Turdus fuscater*) in highland of Colombia. *Parasitology research*, 112(12), 4193-4204.
- Marzal, A. 2005. Senescencia, parasitismo, Inmunidad y éxito reproductor en el Avión Común (*Delichon urbica* Linneo 1758). (Doctoral dissertation, Universidad de Extremadura).

- Matta, N. E., Basto, N., Gutierrez, R., Rodríguez, O. A., Greiner, E. C. 2004. Prevalence of blood parasites in Tyrannidae (flycatchers) in the eastern plains of Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (3): 271–274.
- Matta, N. E., Lotta, I. A., Valkiūnas, G., González, A. D., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., Moncada, L. I., Rodríguez, 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. *Parasitology Research* 113 (2): 457–468.
- McMullan, M., Quevedo, A., Donegan, G. 2011. Guía de Campo de las Aves de Colombia. Fundación ProAves, Bogotá.
- 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.
- Moens, M. A. J., Pérez-Tris, J. 2016. Discovering Potential Sources of Emerging Pathogens: South America Is a Reservoir of Generalist Avian Blood Parasites. *International Journal for Parasitology* 46 (1): 41–49.
- Møller, A. P., Nielsen, J. T. 2007. Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. *Ecology* 88 (4): 871–881.
- Morales-Betancourt, J. A., Estévez-Varón, J. V. 2006. El páramo: Ecosistema en vía de extinción. *Revista Luna Azul* 22: 39–51.
- Ortego, J., Calabuig, G., Cordero, P. J., Aparicio, J. M. 2007. Genetic Characterization of Avian Malaria (Protozoa) in the Endangered Lesser Kestrel, *Falco Naumanni*. *Parasitology Research* 101 (4): 1153–1156.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Krizanauskiene, A., Bensch, S., Bolshakov, C. V. 2009. *Plasmodium Relictum* (lineage P-SGS1): Further Observation of Effects on Experimentally Infected Passeriform Birds, with Remarks on Treatment with Malarone<sup>TM</sup>. *Experimental Parasitology* 123 (2): 134–139.
- Pagenkopp, K. M., Klicka, J., Durrant, K. L., Garvin, J. C., Fleischer, R. C. 2008. Geographic variation in malarial parasite lineages in the common yellowthroat (*Geothlypis trichas*). *Conservation Genetics*, 9(6), 1577-1588.

- Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Waldenström, J., Bensch, S. 2005. What are malaria parasites?. *Trends in parasitology*, 21(5), 209-211.
- Perkins, S. L., Schall, J. J. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 88 (5): 972–978.
- Perkins, S. L. 2008. Molecular systematics of the three mitochondrial protein-coding genes of malaria parasites: Corroborative and new evidence for the origins of human malaria: Full-length research article. *DNA Sequence*, 19(6), 471-478.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [online.] URL: [http:// www.r-project.org](http://www.r-project.org)
- Ralph, C. J., 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, US Department of Agriculture.*
- Restall, R. O. B. I. N., Rodner, C., Lentino, M. 2006. Birds of northern South America: an identification guide. Volume 1: Species accounts. *United Kingdom: Christopher Helm.*
- Ribeiro, S. F., Sebaio, F., Branquinho, F. C. S., Marini, M. Â., Vago, A. R., Braga, È. M. 2004. Avian Malaria in Brazilian Passerine Birds: Parasitism Detected by Nested PCR Using DNA from Stained Blood Smears. *Parasitology* 130 (3): 261–267.
- Richard, F. A., Sehgal, R. N. M., Jones, H. I., Smith, T. B. 2002. A Comparative Analysis of PCR-Based Detection Methods for Avian Malaria. *Journal of Parasitology* 88 (4): 819–822.
- Ricklefs, R. E., Fallon, S. M. 2002. Diversification and Host Switching in Avian Malaria Parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269 (1494): 885–892.
- R
- icklefs, R. E., Swanson, B. L., Fallon, S. M., Martínez-Abraín, A., Scheuerlein, A., Gray, J., Latta, S. C. 2005. Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecological Monographs*, 75(4), 543-559.

- Ricklefs, R. E., Outlaw, D. C. 2010. A molecular clock for malaria parasites. *Science*, 329(5988), 226-229.
- Ricklefs, R. E., Outlaw, D. C., Svensson-Coelho, M., Medeiros, M. C., Ellis, V. A., Latta, S. 2014. Species formation by host shifting in avian malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), 14816-14821.
- Rodríguez, O. A., Matta, N. E. 2001. Blood Parasites in Some Birds from Eastern Plains of Colombia. *Memorias do instituto Oswaldo Cruz*, 96(8), 1173-1176.
- Rodríguez, O. A., Moya, H., Matta, N. E. 2009. Avian blood parasites in the National Natural Park Chingaza: high Andes of Colombia. *Hornero*, 24(1), 1-6.
- Sambrook, J. R. D. W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. CHSL Press, New York.
- Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Schaefer, H. M., Segelbacher, G. 2012. Bloodmeal Analysis Reveals Avian Plasmodium Infections and Broad Host Preferences of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) Vectors. Editado por Rick Edward Paul. *PLoS ONE* 7 (2): e31098.
- Santiago-Alarcon, D., Rodríguez-Ferraro, A., Parker, P. G., Ricklefs, R. E. 2014. Different Meal, Same Flavor: Cospeciation and Host Switching of Haemosporidian Parasites in Some Non-Passerine Birds. *Parasites & Vectors* 7 (1): 286.
- 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.
- 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.
- Sebaio, F., Braga, É. M., Branquinho, F., Fecchio, A., Marini, M. A. 2012. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 21 (1): 7–15.

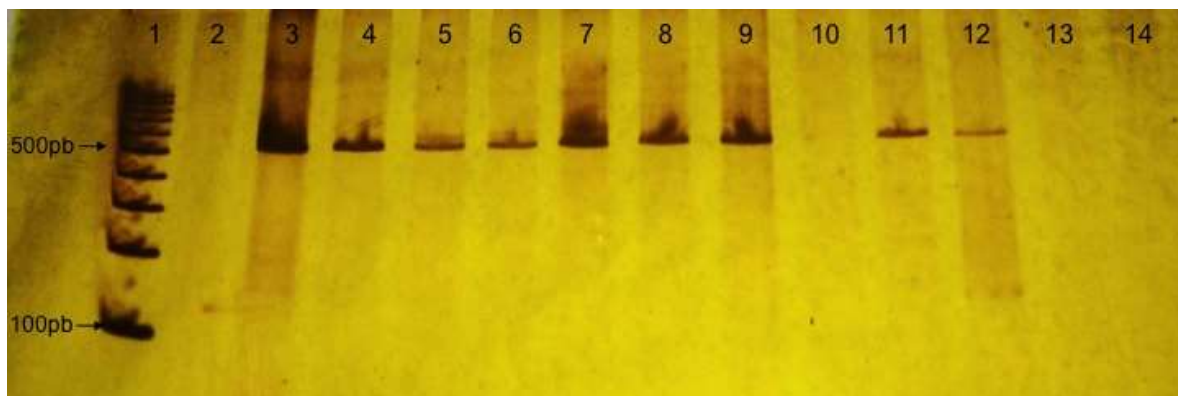
- Schmid, S., Dinkel, A., Mackenstedt, U., Tantely, M. L., Randrianambinintsoa, F. J., Boyer, S., Woog, F. 2017. Avian malaria on Madagascar: bird hosts and putative vector mosquitoes of different Plasmodium lineages. *Parasites & Vectors*, 10(1), 6.
- Stiles, F. G. 1998. Las aves endémicas de Colombia. *Informe nacional sobre el estado de la biodiversidad en Colombia*, 1, 378-385.
- Svensson-Coelho, M., Ellis, V. A., Bette A. L., Blake, J. G., Ricklefs, R. E. 2014. Reciprocal specialization in multihost malaria parasite communities of birds: a temperate-tropical comparison. *The American Naturalist* 184 (5): 624–635.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731–2739.
- Varela, C. H., Ayala, S. 1974. Malaria en aves silvestres, con un hallazgo en un ave migratoria. *Actualidades Biológicas*.
- Valkiūnas, G., Salaman, P., Lezhova, T. A. 2003. Paucity of Hematozoa in Colombian Birds. *Journal of Wildlife Diseases* 39 (2): 445–448.
- Valkiūnas, G. 2005. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC press.
- Valkiūnas, G., Lezhova, T. A., Krizanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R. N. M., Bensch, S. 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology* 94 (6): 1395–1401.
- Valkiūnas, G., Sehgal, R. N., Lezhova, T. A., Hull, A. C. 2010. Identification of *Leucocytozoon toddi* group (Haemosporida: Leucocytozoidae), with remarks on the species taxonomy of leucocytozoids. *Journal of Parasitology*, 96(1), 170-177.
- Vanstreels, R. E. T., Kolesnikovas, C. K. M., Sandri, S., Silveira, P., Belo, N. O., Ferreira Junior, F. C., Epiphanyo, S., Steindel, M., Braga, É M., Catão-Dias, J. L. 2014. Outbreak of Avian Malaria Associated to Multiple Species of Plasmodium in Magellanic Penguins Undergoing Rehabilitation in Southern Brazil. Editado por Tobias Spielmann. *PLoS ONE* 9 (4): e94994.

- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Östman, O. 2004. A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting Plasmodium and Haemoproteus Infections From Avian Blood. *Journal of Parasitology* 90 (1): 191–194.
- Walther, E L., Valkiūnas, G., González, A. D., Matta, N. E., Ricklefs, R. E., Cornel, A., Sehgal, R. N. M. 2014. Description, Molecular Characterization, and Patterns of Distribution of a Widespread New World Avian Malaria Parasite (Haemosporida: Plasmodiidae), *Plasmodium* (Novyella) *Homopolare* Sp. Nov.” *Parasitology Research* 113 (9): 3319–3332.
- White, E. M., Greiner, E. C., Bennett, G. F., Herman, C. M. 1978. Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. *Revista de Biología Tropical*, 26, 43-102.
- Zahar, A. R. 1951. The ecology and distribution of black-flies (Simuliidae) in south-east Scotland. *The Journal of Animal Ecology*, 33-62.
- Zamora-Vilchis, I., Williams, S. E., Johnson, C. N. 2012. Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate. *PLoS One*, 7(6), e39208.

## Apéndices

### Apéndice A. Producto de PCR anidada (524pb) usando los cebadores Haemf y HaemR2 (Helgreen et al., 2004).

Se observa el marcador de peso molecular de 100pb Thermo Scientific (pozo 1); control negativo (pozo 2); control positivo de la reacción de PCR (pozo 3); muestras positivas para infección por parásitos causantes de Malaria aviar (pozos 4-9, 11 y 12) y muestras negativas (pozos 10, 13 y 14).



Apéndice B. Nomenclatura utilizada, para llevar a cabo el análisis NMDS, de los distintos muestreos realizados en las localidades de estudio.

Localidad		<i>Haemoproteus</i>	<i>Parahaemoproteus</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Leucocytozoon</i>
<b>La Colorada</b>					
febrero 2012	C1	1	13	8	
diciembre 2012	C2		6	5	
marzo 2013	C3		13	3	
junio 2013	C4			1	
agosto 2015	C5			1	
<b>San Bernardo La Cuchilla</b>					
mayo 2012	B1	3	2	1	
mayo 2013	B2	1	4	2	
<b>El Aburrido</b>					
julio 2012	A1		8	5	
febrero 2014	A2	1	9		
agosto 2014	A3	1	1		
<b>Los Helechales</b>					
agosto 2012	H1	1	1		
enero 2013	H2	1	2	1	
mayo 2013	H3		3		
junio 2013	H4				
<b>San Benito</b>					
diciembre 2014	SB1				
marzo 2015	SB2				
junio 2015	SB3				
noviembre 2015	SB4		2	1	
febrero 2016	SB5				
<b>El Salado</b>					
julio 2015	S1				2
septiembre 2015	S2		1		

Los números indican la cantidad de muestras detectadas de cada tipo de hemosporidio en las distintas localidades.