## Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

Programa universitario de investigación de la DIGI

# Interacciones parásito-vector de malaria aviar en áreas naturales y urbanas en el oriente de Guatemala

Nombre del proyecto de investigación

#### B11CU

Código del proyecto de investigación

#### 4.8.58.0.79

Partida presupuestaria del proyecto de investigación

## Instituto de Investigaciones del Centro Universitario de Zacapa

Unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

## Michelle Bustamante Castillo, Coordinadora Manuel Alejandro Barrios Izás, Investigador MSC. Estefany de León, Investigadora

Nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

## Zacapa, 28 de febrero de 2023

Lugar y fecha de presentación del informe final

#### **Autoridades**

Dra. Alice Burgos Paniagua Directora General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Coordinador Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

Dr. Carlos Augusto Vargas Gálvez Director Centro Universitario de Zacapa, USAC

Dr. Manuel Alejandro Barrios Izás Coordinador Instituto de Investigaciones, Centro Universitario de Zacapa, USAC

#### Autores

Dra. Michelle Bustamante Castillo, coordinadora del proyecto Instituto de Investigaciones, Centro Universitario de Zacapa, USAC

Dr. Manuel Alejandro Barrios Izás, investigador Instituto de Investigaciones, Centro Universitario de Zacapa, USAC

M.Sc. Estefany de León, investigadora Instituto de Investigaciones, Centro Universitario de Zacapa, USAC

#### Colaboradores

Br. Ana Cristina Hernández, Investigadora, IICUNZAC, USAC
Br. Marvin Antón, Auxiliar de laboratorio, IICUNZAC, USAC
Licda. María Victoria Ríos Gálvez, Auxiliar de investigación, IICUNZAC, USAC
Marcos Romeo Archila Ruiz, técnico de campo.
Denilson Cordón, técnico de campo.

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de del código B11CU en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas. Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

#### **Agradecimientos**

Al Licenciado Jimmy Alexander Vargas Salguero (tesorero de CUNZAC) por su excelente trabajo en la ejecución financiera del proyecto. Gracias a su apoyo fue posible la compra rápida de insumos para el proyecto cuando los fondos fueron puestos a disposición del proyecto.

A Ingenieros Adrián Francisco Salguero por su amabilidad y apoyo al proyecto. Gracias por permitirnos muestrear en sus fincas y apoyarnos en el trabajo de campo.

A los ingenieros Emerio Portillo, Carlos Vargas Gálvez y Bryan López por permitirnos muestrear en sus fincas y sitios de trabajo.

A Don Juan Alvarado, guardarecursos del Parque Regional Municipal Niño Dormido por su excelente trabajo y apoyo en el trabajo de campo realizado en la reserva a su cargo.



## Universidad de San Carlos de Guatemala Dirección General de Investigación



## 1 Índice general

| Indice general  | 4  |
|---|----|
| Índice de figuras   | 5  |
| 2 Resumen   | 6  |
| 3 Introducción  | 7  |
| Planteamiento del problema                                      | 8  |
| 5 Delimitación en tiempo y espacio                              | 9  |
| 6.1 Delimitación en tiempo                                      | 9  |
| 6.2 Delimitación espacial                                       | 10 |
| 6 Marco teórico   | 11 |
| 7 Estado del arte   | 13 |
| 8 Objetivos   | 14 |
| O Hipótesis   | 14 |
| 10 Materiales y métodos   | 15 |
| 10.1 Enfoque de la investigación                                | 15 |
| 10.3 Recolección de información                                 | 15 |
| 10.4 Procesamiento y análisis de la información                 | 17 |
| 11 Resultados y discusión                                       | 21 |
| 12 Referencias  | 38 |
| 13 Apéndice   | 44 |
| 14 Aspectos éticos y legales (si aplica)                        | 67 |
| 15 Vinculación  | 67 |
| 16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual | 67 |

## Índice de figuras

| Figura 1. | Mapa de ubicación de sitios de muestreo y clasificación de los sitios según su tipo de uso del suelo   | 10 |
|-----------|--|----|
| Figura 2. | Curva de acumulación de especies de insectos potenciales vectores de malaria aviar por muestra en el área de estudio   | 23 |
| Figura 3. | Análisis de escalamiento multidimensional (MDS) sobre la composición de potenciales vectores de malaria aviar según tipo de uso de suelo                                       | 24 |
| Figura 4. | Número total de individuos de distintos grupos de insectos potenciales vectores de malaria aviar que fueron capturados empleando trampas BG-Sentinel y CDC light en el estudio | 26 |

#### 2 Resumen

Los estudios sobre los vectores de malaria aviar siguen siendo escasos en el neotrópico y el papel de los insectos endémicos sigue sin estar claro en la transmisión de esta enfermedad. A diferencia de la malaria en humanos, trasmitida solo por mosquitos Anophelinae, la malaria aviar se trasmite por un conjunto más extenso de insectos por lo que se debe estudiar un espectro más amplio de vectores. Además, es indispensable estudiar el efecto de la urbanización pues esta afecta las dinámicas de transmisión de estos parásitos. En este estudio, registramos tres de las cuatro familias de insectos que actúan como vectores de la malaria aviar para América, Culicidae, Ceratopogonidae y Simulidae. La familia Culicidae la mejor representada (94% de los individuos capturados) y distribuida en el área estudiada. A partir de las muestras analizadas con herramientas moleculares identificamos once especies potenciales vectores de malaria aviar en el área de estudio. De estas, Culex pipiens y Aedes aegypti fueron las más abundantes en relación al total de individuos capturados. Las especies Aedes aegypti, Culex pipens, Anopheles albimanus y Haemagogus janthinomys se registraron de cuatro a más municipios muestreados; el resto se registraron en dos o tres de los municipios que formaron parte del estudio. Los análisis genéticos y ecológicos revelaron una importante riqueza y abundancia de insectos potenciales vectores de malaria aviar en el departamento de Zacapa, lo que indica la posibilidad de brotes de esta enfermedad en aves silvestres y de corral, así como otras arbovirosis transmitidas por estos vectores.

Palabras clave: Malaria aviar, Vectores de enfermedades, Insectos endémicos, Transmisión de enfermedades zoonóticas, Vigilancia epidemiológica

#### **Abstract**

Studies on avian malaria vectors remain scarce in the neotropics and the role of endemic insects in the transmission of this disease is still unclear. Unlike human malaria, which is transmitted only by Anophelinae mosquitoes, avian malaria is transmitted by a more extensive range of insects, so a broader spectrum of vectors must be studied. Additionally, it is essential to study the effect of urbanization, as this affects the dynamics of parasite transmission. In this study, we recorded three of the four families of insects that act as avian malaria vectors for the Americas, Culicidae, Ceratopogonidae, and Simulidae. The Culicidae family was the best represented (94% of captured individuals) and distributed in the study area. From the samples analyzed with molecular tools, we identified eleven potential avian malaria vector species in the study area. Of these, *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* were the most abundant in relation to the total number of captured individuals. The species *Aedes aegypti*, *Culex pipens*, *Anopheles albimanus*, and *Haemagogus janthinomys* were recorded in four or more sampled areas; the rest were recorded in two or three sites that were part of the study. Genetic and ecological analyses revealed significant richness and abundance of potential avian malaria vectors in the department of Zacapa, indicating the possibility of outbreaks of this disease in wild and domestic birds, as well as other arboviruses transmitted by these vectors.

**Keywords:** Avian malaria, Disease vectors, Endemic insects, Zoonotic disease transmission, Epidemiological surveillance.

#### 3 Introducción

La malaria aviar constituye un excelente modelo para el estudio de la dinámica de transmisión de parásitos en animales a través de vectores (Lapointe et al., 2012; Rivero & Gandon, 2018). En la actualidad, la interacción parásito-hospedero de malaria ha sido mejor estudiada que la interacción vector-parásito. Además, la mayor parte de la investigación sobre vectores se concentra en mosquitos del género *Anopheles*, transmisores de los hemosporidios del género *Plasmodium*, que causan malaria humana (Enayati & Hemingway, 2010). Esto ha provocado un sesgo hacia el estudio de un grupo reducido de vectores de la enfermedad y un desconocimiento sobre la dinámica de transmisión a aves silvestres y cautivas y sobre su potencial zoonótico.

Por otro lado, pocos estudios sobre transmisión de enfermedades transmitidas por vectores toman en cuenta el efecto de las actividades humanas como la deforestación, urbanización y cambio de uso del suelo. Tomar en cuesta estos factores es indispensable ya que, bajo estos escenarios alterados, los vectores especializados en un grupo de vertebrados pueden verse obligados a cambiar de presas como consecuencia de un cambio de composición en la comunidad de hospederos (Lyimo et al., 2009). De hecho, algunos estudios muestran que la urbanización y cambio del uso del suelo tiene el potencial de favorecer la transmisión y aumentar la prevalencia de enfermedades vectoriales en animales silvestre, de crianza y en humanos (e.g. Leishmaniasis, Chagas, Oncocercosis y Malaria) (Patz et. al 2000; Pongsiri eta al 2009; Romero-Álvarez & Escobar 2017).

La región del oriente del país es un escenario adecuado para el estudio de la relación vector-parásito de malaria en ambientes perturbados. Los bosques secos de esta región han sufrido tasas intensas de deforestación y perturbación, con la reutilización de las tierras para agricultura extensiva, ganadería y establecimiento de centros urbanos. Esta pérdida del hábitat e incremento de la urbanización puede tener importantes implicaciones en la dinámica de transmisión de vectores de malaria de sitios silvestres a áreas más perturbadas, con el potencial de afectar aves cautivas, de traspatio e incluso a humanos.

De hecho, en la región del oriente ya se han reportado brotes de malaria aviar y presencia de estos patógenos en aves de crianza tecnificada y de traspatio (Arocha-López, 2019). Además, se ha detectado una importante prevalencia de parásitos de malaria aviar en aves silvestres, principalmente aves de áreas con cierto nivel de urbanización (Bustamante-Castillo et al., 2022). Además, el consecuente incremento en el aprovechamiento de la biodiversidad (e.g. extracción de fauna silvestre, colecta de material vegetal, extracción selectiva de leña, entre otros) como resultado de esta perturbación ha incrementado la interacción entre la fauna silvestre y los humanos, acrecentando la posibilidad de transmisión de patógenos desde áreas naturales a sitios con mayor presencia humana.

El estudio de la transmisión de malaria aviar en esta región es relevante pues gran parte de la población humana asentada en esta área vive en condiciones de pobreza y el brote de enfermedades transvectoriales, como la malaria aviar, pueden causar pérdidas económicas importantes si afectan a las aves de crianza tecnificada, de traspatio o corral. Además, la ocurrencia de una nueva zoonosis podría poner en peligro a los comunitarios de las aldeas más pobres.

En la región del oriente del país han sido escasos los estudios para identificar las especies de mosquitos potenciales vectores de malaria aviar y otros patógenos que atacan animales silvestres, de crianza y humanos. Mucho se desconoce sobre la diversidad y abundancia de estos vectores y su potencial como transmisores de malaria aviar. Los estudios encaminados a conocer estos parámetros ecológicos de las poblaciones de mosquitos selváticos y urbanos, permiten establecer el riesgo de transmisión de estas enfermedades y aportar recomendaciones a las autoridades de salud, sobre prevención, vigilancia y posible control de estas especies en la zona.

La presente investigación identificó especies de mosquitos otros insectos potenciales vectores de malaria aviar que pueden transmitir la enfermedad a aves silvestres, de corral e incluso a humanos. En el departamento de Zacapa. En este trabajo analizamos la diversidad y abundancia de estos insectos y su potencial como transmisores de malaria aviar. Además, se realizaron pruebas para establecer la presencia de los parásitos de malaria aviar en pools de insectos capturados en el área de estudio.

Para realizar este estudio empleamos trampas BGA y CDC de luz para capturar un espectro amplio de potenciales vectores de la enfermedad. Las trampas se ubicaron en área naturales y urbanas de Zacapa. La identificación de los vectores se realizó empleando claves dicotómicas herramientas moleculares. A partir de grupos de potenciales vectores de malaria aviar se determinó la prevalencia de hemosporidios mediante diagnóstico molecular empleando un PCR anidada (Ciloglu et al., 2019).

#### 4 Planteamiento del problema

En la actualidad, los patrones generales de infección por malaria en aves han sido bien estudiados. Sin embargo, se sabe poco sobre los vectores y la diversidad de parásitos dentro de ellos, conocimiento esencial para entender la ecología de esta enfermedad y tomar medidas preventivas de transmisión en aves cautivas, de traspatio y/o en humanos. En general, la mayor parte de la investigación sobre vectores de malaria se concentran en la familia Culicidae, y existe un sesgo hacia el estudio del género *Anopheles*, por ser los vectores de los hemosporidios del género *Plasmodium*, que causan la malaria en humanos (Enayati & Hemingway, 2010; Santiago-alarcon, 2020). Esto hace necesario estudiar un espectro más amplio de vectores y el uso de distintas técnicas de captura que tengan en cuenta diferencias en la biología de las distintas especies según la región.

Por otro lado, se sabe que la perturbación de origen antrópico (e.g. urbanización, deforestación, cambio de uso del suelo para agricultura, entre otros) afecta la ecología de la interacción parásito-vector (Santiago-Alarcón y Delgado-V, 2017). Por ejemplo, la deforestación y la urbanización disminuye la biodiversidad de un ecosistema y reemplaza las presas silvestres de los

vectores por animales cautivos o por humanos. Esto también puede favorecer espacios de reproducción de los vectores (e.g. a nivel domiciliar en sitios donde se almacena inadecuadamente el agua) lo que puede provocar un incremento de abundancia y riqueza de vectores y prevalencia de los parásitos que estos transmiten (Ferraguti J. M., 2020).

Por otro lado, la región de bosque seco del oriente del país ha sufrido tasas intensas de deforestación y perturbación, con la reutilización de las tierras para agricultura extensiva (ej. melón, sandía, mango, limón, tabaco, entre otros), crianza de ganado y la expansión de centros urbanos. Esta pérdida y perturbación del hábitat puede tener importantes implicaciones en la dinámica de transmisión de parásitos de malaria de sitios silvestres a áreas más perturbadas a través de sus vectores, con el potencial de afectar aves cautivas, de traspatio e incluso a humanos. Además, el consecuente incremento en el aprovechamiento de la biodiversidad (e.g. extracción de fauna silvestre, colecta de material vegetal, extracción selectiva de leña, entre otros) como resultado de la perturbación ocurre en esta área ha incrementado la interacción entre la fauna silvestre y los humanos, acrecentando aún más la posibilidad de transmisión de patógenos desde áreas naturales a sitios con mayor presencia humana.

La aparición de enfermedades trans-vectoriales con potencial para causar pérdida en aves de crianza, de corral o traspatio, puede tener consecuencias negativas en la economía y seguridad alimentaria de las comunidades asentadas en esta región. Además, el surgimiento de enfermedades zoonóticas podría poner en peligro a comunidades con situación nutricional comprometida. De hecho, en el oriente ya se han reportado brotes de malaria aviar y presencia de estos patógenos en aves de crianza tecnificada, de traspatio (Arocha-López, 2019) y en aves silvestres en sitios cercanos a comunidades humanas (Bustamante-Castillo et al., 2022). Sin embargo, no se ha explorado estas áreas en busca de estudiar la interacción vector-parásito y los mecanismos ecológicos que pueden facilitar el riesgo de contagio de esta enfermedad.

El estudio de la interacción vector-parásito, junto al ya iniciado estudio de la interacción hospedero silvestre/cautivo y sus parásitos en la región, puede permitir identificar potenciales sitios de riesgo de trasmisión de la enfermedad a animales y humanos (Romero-Álvarez & Escobar 2017), a desarrollar sistemas de alerta temprana de brotes, puede contribuir a abastecer de forma temprana y adecuada centros de salud animal y humana e incluso justificar la protección de áreas naturales (King, 2014).

#### 5 Delimitación en tiempo y espacio

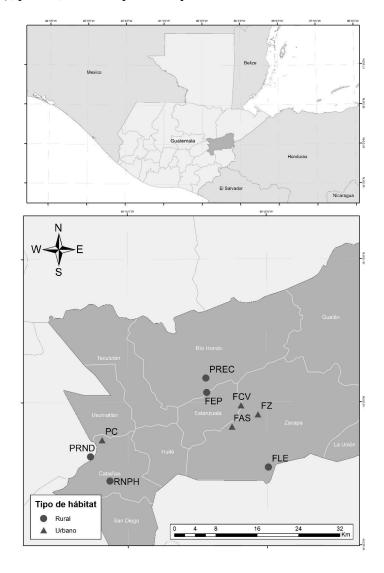
#### 6.1 Delimitación en tiempo

El estudio se llevó a cabo de febrero a diciembre del 2022; la fase de campo inicio en marzo de 2022 y la de laboratorio en abril de 2022. La fase de laboratorio incluyó tanto el procesamiento de las muestras colectadas en el laboratorio de entomología del CUNZAC como el procesamiento de muestras en el laboratorio de Biología Molecular del CUNZAC donde se extrajo ADN tanto de

potenciales vectores de malaria como de los parásitos que estos pudieran acarrear en el área de estudio.

## 6.2 Delimitación espacial

El estudio se llevó a cabo en el oriente del país, en la Región Semiárida del Valle del Motagua -RSVM- en el departamento de Zacapa. La RSVM está ubicada en el este de Guatemala, entre 300 a 900 msnm (Mapa del área de estudio en Figura 1). La temperatura media anual de esta área es de 26.9 ° C, y la precipitación anual promedio es de 815 mm. El clima es tropical subhúmedo, con una estación seca que dura de 5 a 7 meses, generalmente de noviembre a mayo (Nájera-Acevedo, 2006). El área se compone de un mosaico de parches de bosques secos tropicales alterados en una matriz de usos de la tierra antropogénicos que incluyen cultivos (principalmente de melón, sandía, limón, tabaco, mango y okra), pastos, áreas de pastoreo y asentamientos humanos.



**Figura 1.** Mapa del área de estudio. El área muestreada se observa en gris oscuro. Se indica la ubicación de sitios de muestreo y clasificación de los sitios según su tipo de uso del suelo. En color gris intenso se observa el Departamento de Zacapa. PRND = PRM Niño Dormido, RNPH = Reserva Heloderma, PREC = Parque Regional Municipal El Castillo, FLE = Finca Los Encuentros, FEP = Finca Emerio Portillo, FAS = Finca Adrián Salguero, FCV = Finca Vargas, PC = Pueblo Cabañas y FZ = Finca Zacapa.

#### 6 Marco teórico

#### Malaria aviar

La malaria aviar es una enfermedad causada por distintas especies de protozoarios parásitos sanguíneos (Valkiunas, 2005). Los parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium, Haemoproteus, Leucocytozoon*) pertenecen al grupo de protozoarios del filum Apicomplexa. Son parásitos cosmopolitas registrados en diversos grupos de aves y en todo el mundo, excepto en la Antártida. Esta enfermedad ataca a numerosas especies de aves e incluso está llevando a la extinción a algunas especies que habitan en islas. Por ejemplo, *Plasmodium relictum*, y el mosquito vector que lo transmite, causó declives y extinciones entre la comunidad de aves de Hawaii (Atkinson et al., 1995) En algunas partes del mundo se han registrado pérdidas totales de las aves de crianza en granjas avícolas a causa de esta enfermedad. Por ello, un incremento de malaria aviar puede significar no sólo pérdidas de biodiversidad, sino también un impacto negativo a gran escala en la actividad avícola (Valkiunas, 2005).

#### Ciclo de vida de los parásitos de malaria aviar

En general, los parásitos causantes de la malaria aviar deben completar distintas fases de su ciclo de vida y desarrollarse para alcanzar etapas infectivas. La maduración permite lograr exitosamente su transmisión a un nuevo individuo, empleando un vector. Los vectores son insectos dípteros cuya función es transmitir y permitir el desarrollo del ciclo sexual y asexual dentro de ellos (Martínez-deLaPuente & Ferraguti, 2020). Los vectores se alimentan de aves hemoparasitadas, estos ingieren esporogonias cargadas de microgametocitos que dentro de él comienzan un proceso de exflagelación, formando fases flageladas móviles llamados microgametos. Mientras los macrogametocitos maduran y se transforman en macrogametos, los cuales son fecundados por los microgametos formando un cigoto. El cigoto se convierte en oocineto. Este último se ancla a la pared epitelial del intestino del mosquito desarrollando oocistos. Los oocistos son mórulas de incubación que permiten el desarrollo de las fases infectivas.

Una vez que los oocistos han incubado en este ambiente, se desarrolla en ellos los esporozoitos, la fase infectiva de los parásitos. Cuando estos alcanzan la madurez, rompen el oocisto y a través de la hemolinfa se diseminan por todo el cuerpo del vector hasta llegar a las glándulas salivales, donde se acumulan. Cuando el vector penetra el tejido de un individuo para alimentarse de su sangre, inocula a los parásitos con su saliva. Esta saliva viene cargada de esporozoitos que se movilizan a través del

torrente sanguíneo del nuevo hospedador. En este nuevo hospedador se desarrolló de la fase asexual del parasito (Santiago-Alarcon, Palinauskas, et al., 2012). Los esporozoitos son los responsables de establecer la enfermedad en el hospedador, y cuando se han alimentado y finalizado su maduración forman una esporogonia que contiene a los gametocitos (microgametocitos y macrogametocitos) los cuales serán nuevamente ingeridos por los parásitos vectores al alimentarse del ave que los hospeda.

El Orden Díptera y las familias con especies transmisoras de malaria aviar

El orden Diptera es uno de los órdenes de insectos más diverso con alrededor de 159,000 especies descritas en todo el mundo, y con aproximadamente de 32,500 especies en el Neotrópico (Borkent y Brown, 2015). Las especies de dípteros relevantes con relación a la transmisión de patógenos como la malaria son las hematófagas (que constituyen únicamente el 10% de las especies de este orden), quienes en etapa adulta se alimentan de sangre de vertebrados (aunque llenan sus requerimientos nutricionales con otros recursos como néctar). Dentro de este último grupo, cuatro familias poseen especies que son vectores de hemosporidios de aves: Culicidae (mosquitos), Simuliidae (moscas negras), Ceratopogonidae (mosquitos mordedores, chaquistes, purrujas, entre otros) y Hippoboscidae.

Los Culicidae incluyen principalmente especies con hembras hematófagas (con etapas inmaduras acuáticas). Este grupo incluye las especies de insectos más importantes asociadas a enfermedades epidémicas como la malaria. Varias especies de este grupo son transmisores del género Plasmodium (Santiago-alarcon, 2020). Los Simuliidae son un grupo relativamente pequeño que incluye principalmente especies con hembras hematófagas. De los 32 géneros de esta familia, los géneros Austrosimulium, Cnephia, Prosimulium y Simulium tienen especie relacionas a la transmisión de patógenos. En la familia Ceratopogonidae los géneros Culicoides, Leptoconops, Austroconops y Forcipomyia incluyen hembras hematófagas, y solo especies del género Culicoides son vectores de Haemosporidios de aves (Borkent y Brown, 2015). Finalmente, los Hippoboscidae se conocen comúnmente como moscas piojo y exhiben algunas adaptaciones para la vida parasitaria (como el desarrollo intrauterino completo de la larva). Las moscas piojo son vectores de patógenos aviares como las especies del género Trypanosoma y Haemoproteus (Santiago-Alarcon, Palinauskas, et al., 2012). Generalmente se acepta que las especies de mosquitos (Culicidae) de diferentes géneros transmiten parásitos del género Plasmodium. Haemoproteus (Parahaemoproteus) se transmiten por los mosquitos que pican, en su mayoría de género Culicoides (Ceratopogonidae), mientras que Haemoproteus (Haemoproteus) se transmiten por moscas piojo (Hippoboscidae). Las especies de Leucocytozoon se transmiten por moscas negras (Simuliidae), pero Leucocytozoon (Akiba) caulleryi (la única especie de este subgénero que infecta a las aves) es transmitida por moscas ceratopogonidas. Existe alguna evidencia de que la única especie del género Fallisia que infecta aves se transmiten por mosquitos de la subfamilia Culicidae (Santiago-Alarcon, Palinauskas, et al., 2012). Además, la mayor parte de la investigación sobre los vectores hemosporidianos se concentra en los Culicidae.

Malaria aviar y su relación con niveles de perturbación antrópica

Mientras las poblaciones humanas aumentan en todo el mundo, los bosques se transforman drásticamente. Durante este proceso la invasión de los suelos genera un aumento en la tasa de contacto entre mosquitos y hospedadores susceptibles. La relación entre la pérdida de biodiversidad y la aparición de enfermedades se basó originalmente en la hipótesis del efecto de dilución. Esta hipótesis predice que diversas comunidades ecológicas limitan la propagación de enfermedades a través de varios mecanismos. Por lo tanto, la pérdida de diversidad podría agravar las epidemias que dañan a los seres humanos y la vida silvestre.

Lo que sí está claro es que la pérdida de biodiversidad interrumpe la interacción que existe entre parasito y hospedador, aumentando así, los brotes de enfermedades transmitidas por vectores en otros vertebrados (Martínez-deLaPuente & Ferraguti, 2020). Además, la invasión de zonas boscosas por actividades antrópicas disminuye claramente la población de aves silvestres lo cual podría suponer la disminución en la población de hemosporidios en circulación (De La Torre et al., 2021). En este sentido, Ferraguti y colaboradores (2017) evaluaron la capacidad de transmisión de parásitos del género *Plasmodium* sp. y establecieron dos procesos importantes para lograr el éxito en la transmisión: 1. La tasa de contacto entre mosquitos y hospedadores vertebrados infectados y susceptibles a la infección, y 2. la capacidad de desarrollo del patógeno en el interior del mosquito. La perturbación y destrucción del hábitat parece tener un efecto importante en la tasa de contacto entre el vector y los parásitos. Asimismo, Ferraguti (2017), obtuvo evidencias en su tesis doctoral de que actualmente es más común encontrar aves infectadas con parásitos causantes de malaria aviar en las zonas urbanas

Además, la transformación de los suelos genera también cambios en el comportamiento de alimentación de los mosquitos y por lo tanto la capacidad de desarrollar a los parásitos dentro de ellos se vuelve más exitosa (Ferraguti et al., 2018). Por ejemplo, la urbanización puede favorecer espacios de reproducción de los vectores (e.g. a nivel domiciliar donde se almacene inadecuadamente el agua) lo que puede provocar un incremento de abundancia y riqueza de vectores y prevalencia de los parásitos que estos transmiten (Martínez-deLaPuente & Ferraguti, 2020). En este sentido, hay que tomar en cuenta que la perturbación y la pérdida de hábitat pueden afectar algunas interacciones vector-parásito o hospedero-parásito más que a otras. Por ejemplo, varios estudios han establecido un vínculo entre los patrones de deforestación y la abundancia de *Anopheles darlingi* Root, 1926, uno de los vectores de malaria más importantes en el Neotrópico.

#### 7 Estado del arte

El conocimiento sobre la distribución de los vectores transmisores de hemosporidios aviares en América y sus zonas tropicales es escaso, y existen diversos aspectos de la ecología de esta enfermedad que aún no han sido bien estudiados. En particular, para el neotrópico, se tiene más clara la dinámica de la interacción hospedero-parásito que la del vector-parásito (Santiago-alarcon, 2020). Además, la mayor parte de la investigación sobre vectores de hemosporidios se concentra en la familia Culicidae. De este grupo, los mosquitos del género *Anopheles* han sido los más estudiados

por ser los principales vectores de los parásitos del género Plasmodium, que causa la malaria en humanos.

En general, la evidencia sugiere que en zonas boscosas y en aves de vida silvestre de América, es posible encontrar una diversidad importante de hemosporidios aviares (Marroquin-Flores et al., 2017). En México se han identificado algunos grupos de mosquitos adultos del género Culicidae del sector rural y algunos hemosporidios aviares en estos vectores, así como su preferencia alimenticia. Estos estudios han mostrado una preferencia de los mosquitos hacia los humanos y ganado bovino (Abella-Medrano, Ibáñez-Bernal).

En Guatemala, los estudios sobre vectores de hemosporidios son escasos y se centran en los transmisores de malaria humana. Por ejemplo, un estudio para identificar vectores relacionados con enfermedades zoonóticas virales en Jutiapa detecto a *Aedeomyia aquiamipennis*, en diversas lagunas y ríos del territorio. (Diéguez-Fernández et al., 2006). Este último es un vector relacionado con la transmisión del virus Gamboa, pero también de malaria aviar (Cuevas et al., 2020).

Además, otras investigaciones han identificado ya algunos hemosporidios menos comunes en aves silvestres en cautiverio de centros de rescate y en aves de producción en distintas regiones del país (Salazar, 2012; Jauregui, 2014; López & José, 2018; De León, 2019). Sin embargo, a pesar del importante papel de los vectores en el mantenimiento de la diversidad de hemosporidios aviares cercanos a la población humana rural y urbana, el estudio de sus vectores no ha sido incorporado en ninguno de los estudios en el país.

#### 8 Objetivos

#### General

Analizar la riqueza de potenciales vectores de malaria aviar y la prevalencia de géneros de hemosporidios causantes de esta enfermedad en áreas rurales y urbanas en el oriente de Guatemala.

#### **Específicos**

- 1. Identificar las familias de vectores de malaria aviar en el área de estudio.
- 2. Determinar la riqueza y prevalencia de géneros de hemosporidios presentes en las familias de insectos potenciales vectores identificados en el área de estudio.
- 3. Comparar la prevalencia de géneros de hemosporidios presentes en áreas naturales y áreas urbanas del sitio de estudio.

## 9 Hipótesis

No aplica.

#### 10 Materiales y métodos

#### 10.1 Enfoque de la investigación

Este proyecto tuvo un enfoque cuantitativo pues se basa en la recolección de datos de campo, análisis de laboratorio y análisis estadísticos para establecer la asociación entre la prevalencia de infección por parásitos de malaria aviar en mosquitos vectores en respuesta a distintos tipos de hábitat.

Esta investigación fue descriptiva y correlacional. Fue descriptiva pues se describieron las especies de dípteros potenciales vectores de malaria aviar en el área de estudio y se hizo una descripción de la prevalencia de malaria en distintos grupos de vectores. El estudio es correlacional pues analizará la asociación de la riqueza de vectores y la presencia de parásitos de malaria según distintos tipos de hábitat en el área de estudio.

#### 10.2Método

#### 10.3 Recolección de información

Se visitaron nueve sitios de muestreo distribuidos en áreas de bosque seco del departamento de Zacapa. Se establecieron cinco áreas en sitios urbanos y/o perturbadas y cuatro en áreas rurales. La clasificación de los sitios de muestreo se realizó en base a si constituían áreas urbanas o periurbanas o si se encuentran alejadas de asentamientos humanos (Cuadro 1). En cada sitio se estableció un transecto lineal de muestreo. Sobre este transecto se ubicaron cuatro trampas BG y cuatro trampas CDC. Las trampas se intercalaron dejando al menos 100 m lineales (estimados con GPS) para evitar competencia entre trampas. Cada trampa se identificó empleando cinca forestal y en cada cinta se incluyó la siguiente información: fecha, código de la localidad y tipo de trampa.

Para la captura de los insectos de interés se emplearon trampas BG-Sentinel 2 y trampas CDC de luz ultravioleta. Las trampas BG se cebaron con el atrayente para mosquitos BG-Lure que tiene una combinación de tres componentes que imitan el olor de la piel humana. Además, se cebaron con un sistema de generación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por fermentación con levadura activada. La levadura activada se preparó empleando levadura para panadería, azúcar y agua. Estos cebos se colocaron con el fin de incrementar la probabilidad de captura de insectos potenciales vectores de malaria en la zona (Smallegange et al., 2010).

**Cuadro 1.** Nombre, ubicación y clasificación según uso del suelo de las nueve áreas de muestreo del del estudio.

| Código de lugar | Nombre del sitio                         | N         | W           | Municipio  | Uso    |
|-----------------|--|-----------|-------------|------------|--------|
| PRND            | PRM Niño Dormido                         | 14.90542  | -89.81735   | Cabañas    | rural  |
| RNPH            | Reserva Heloderma                        | 14.86298  | -89.78248   | Cabañas    | rural  |
| PREC            | Parque Regional<br>Municipal El Castillo | 15.04235  | -89.6095    | Rio Hondo  | rural  |
| FLE             | Finca Los Encuentros                     | 14.88654  | -89.4977131 | Zacapa     | rural  |
| FEP             | Finca Emerio Portillo                    | 15.01711  | -89.60807   | Estanzuela | rural  |
| FAS             | Finca Adrián Salguero                    | 14.95724  | -89.56281   | Zacapa     | urbano |
| FCV             | Finca Carlos Vargas                      | 14.99425  | -89.5466    | Zacapa     | urbano |
| PC              | Pueblo Cabañas                           | 14.934188 | 89.796576   | Cabañas    | urbano |
| FZ              | Finca Zacapa.                            | 14.9783   | 89.51612    | Zacapa     | urbano |

Las trampas se ubicaron siempre bajo sombra y alejadas del viento y lluvia y se activaron generalmente a partir de las 9 am. Las trampas se revisaron cada 24 horas, durante 2 días en cada sitio. Las colectas se realizaron entre abril y noviembre del año 2023. Sin embargo, la mayoría de sitios y muestreos se realizaron entre julio y noviembre de 2023. En cada revisión, se cambió la red de captura de la trampa y las que contenían la colecta se colocaron dentro de recipientes plásticos y estos se transportaron dentro de hieleras para mantener las muestras en buen estado. Las muestras colectadas se refrigeraron hasta su procesamiento el cuál generalmente se llevó a cabo más tarde ese mismo día o el siguiente día.

La clasificación e identificación de insectos de interés se realizó en el laboratorio de entomología del Centro Universitario de Zacapa (CUNZAC). Para ello, se emplearon pinzas de punta fina, cajas de Petri y estereoscopios Leica y Olympus. Inicialmente, de toda la muestra capturada se seleccionaron únicamente los individuos que pertenecían a alguna de las familias de culícidos que se sabe pueden transmitir malaria aviar: Culicidae (mosquitos), Simuliidae (moscas negras), Ceratopogonidae (mosquitos mordedores, chaquistes, purrujas, entre otros) e Hippoboscidae. Para identificar a los insectos de estas familias se emplearon características diagnósticas basadas en el patrón de venación

alar de cada grupo que se describe en el libro "Study of Insects" (Triplehorn & Jhonson, 2005). Algunos especímenes pudieron identificarse hasta género o especie, principalmente culícidos como *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* o *Anopheles albimanus*. Para identificar a estos últimos se emplearon claves de identificación de dípteros incluyendo la clave de identificación de hembras hematófagas que transmiten malaria publicada por Santiago-Alarcón y Marzal (2020) y la clave de identificación de zancudos de Darsie (Darsie, 1994).

Después de la clasificación inicial, todos los individuos identificados se agruparon por fecha de colecta, sitio de colecta y tipo de trampa y se almacenaron en tubos plásticos y se almacenaron en refrigeradores del laboratorio de entomología del Centro Universitario de Zacapa (CUNZAC). Los datos de cada vial se ingresaron en la base de datos del proyecto. Los insectos de la familia Culicidae se colocaron en viales sin alcohol que después se guardaron en un congelador. El resto de insectos potenciales vectores se almacenaron en tubos con alcohol al 95%.

#### 10.4 Procesamiento y análisis de la información

#### 10.1 Técnicas e instrumentos

#### 10.1.1 Identificación molecular de vectores

Extracción de ADN

Se seleccionó un individuo de cada especie de potenciales vectores de malaria aviar. El ADN de los mosquitos se extrajo utilizando el kit de extracción "gMAX DNA MINI KIT" IB47282 (IBI Scientific).

Los especímenes se colocaron en tubos de 1.5 mL y se sumergieron en  $100 \mu\text{L}$  de buffer de lisis (GST Buffer) y  $10 \mu\text{L}$  de proteína K durante 24 h a 60 °C con agitación. Posteriormente, los especímenes se trasladaron a otro tubo y se sumergieron en etanol al 95% para detener la digestión. A la solución de lisis se le agregaron  $100 \mu\text{L}$  GSB Buffer y se mezcló vigorosamente.

Luego se agregaron 2.5 μL de ARNasa y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadieron 100 μL de etanol absoluto y se mezcló vigorosamente. La solución se trasvasó a una columna GS y se centrifugó a 14,000 x g por 1 minuto. El fluido se descartó, a la columna se le añadieron 400 μl de Buffer W1 y se centrifugó por 30 segundos a 14,000 x g. El flujo se descartó nuevamente. Se añadieron 600 μL de Wash Buffer y se centrifugó por 30 segundos a 14,000 x g, el filtrado se descartó nuevamente. Se centrifugó la columna 14-16,000 x g por 5 minutos para secar la columna. Finalmente, se realizó la elución utilizando 30 μL de Elution Buffer. El buffer de elución se dejó reposar durante 1 hora en la columna, se centrifugó a 14,000 x g y se volvió a pasar una vez más por la columna para recuperar más ADN.

#### Cuantificación del ADN extraído

Para la cuantificación del ADN se usó el método de fluorescencia con el equipo Qubit3. Inicialmente, se calibró el equipo con los estándares S1 y S2 y luego se prepararon los tubos con 199  $\mu$ L de buffer y 1  $\mu$ L del ADN extraído; las lecturas se realizaron en ng/ $\mu$ L. Todas las muestras que tenían una concentración mayor a 0.6 ng/ $\mu$ L se guardaron para amplificar la región de la Citocromo Oxidasa 1.

### Amplificación del segmento Citocromo Oxidasa I

Para la amplificación de la secuencia de ADN correspondiente a la Citocromo Oxidasa 1 la reacción se preparó de la siguiente manera: 1X JumpStart<sup>TM</sup> REDTaq® ReadyMix<sup>TM</sup> Reaction Mix y 0.4 μM de cada primer (Jerry: 5'-CAACATTTATTTTGATTTTTGG-3', Pat: 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') y de 1-4 μL de ADN genómico. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Activación a 94°C por dos minutos, luego 5 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 47°C por 30 seg y extensión a 72 °C por 2 minutos; luego 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 51.2°C por 30 seg y extensión a 72 °C por 2 minutos; por último, extensión final a 72 °C por 7 min. Todos los ensayos se realizaron con control negativo.

## Verificación de las amplificaciones

La medición de la cantidad y calidad de los amplicones se realizó en geles de agarosa al 1.2%, a 120 volts, 100 mAh y 5 µl del producto de PCR. La tinción del gel se realizó con SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) mediante adición al gel en una concentración de 1X.

#### Secuenciación

Una vez verificada la calidad y cantidad de los amplicones en los geles de agarosa se prepararon las placas para su envío a Macrogen Korea. Inicialmente las muestras de los amplicones se purificaron por extracción en geles y posteriormente se secuenciaron las muestras utilizando los primers Jerry y Pat en un equipo ABI 3730XL.

#### 10.1.2 Identificación de los hemoparásitos de malaria

#### Extracción de ADN

Los vectores de malaria aviar se maceraron en grupos, en un máximo de 10, por cada unidad de estudio. El ADN de los parásitos dentro de los mosquitos se extrajo utilizando el kit de extracción "gMAX DNA MINI KIT" IB47282 (IBI Scientific). Los especímenes se colocaron en tubos de 1.5 mL y se sumergieron en 200 μL de buffer de lisis (GST Buffer) y 20 μL de proteína K durante 24 h a 60 °C con agitación. La solución de lisis se trasvasó a otro tubo y se le agregó 100 μL GSB Buffer y se mezcló vigorosamente. Luego se agregaron 2.5 μL de ARNasa y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadieron 100 μL de etanol absoluto y se mezcló vigorosamente. La solución se trasvasó a una columna GS y se centrifugó a 14,000 x g por 1 minuto. El fluido se

descartó, a la columna se le añadieron 400 μl de Buffer W1 y se centrifugó por 30 segundos a 14,000 x g. El flujo se descartó nuevamente. Se añadieron 600 μL de Wash Buffer y se centrifugó por 30 segundos a 14,000 x g, el filtrado se descartó nuevamente. Se centrifugó la columna 14-16,000 x g por 5 minutos para secar la columna. Finalmente, se realizó la elución utilizando 30 μL de Elution Buffer. El buffer de elución se dejó reposar durante 1 hora en la columna, se centrifugó a 14,000 x g y se volvió a pasar una vez más por la columna para recuperar más ADN.

## Verificación del ADN genómico

La medición de la cantidad y calidad del ADN genómico se realizó en geles de agarosa al 0.7%, a 120 volts, 100 mAh y 5 μl de ADN genómico. La tinción del gel se realizó con SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) mediante adición al gel en una concentración de 1X.

#### Amplificación de tres regiones del ADN mitocondrial.

Para la amplificación de la secuencia de ADN correspondiente de tres regiones del ADN mitocondrial, la reacción se preparó de la siguiente manera: 1X JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix y 0.4 μM de cada primer (PMF: 5'-CCTCACGAGTCGATCAGG-3', PMR: 5'-GGAAACCGGCGCTAC-3', HMF: 5'-ATTGGATGTCAATTACCACAATC-3', HMR: 5'-GGGAAGTTTATCCAGGAAGTT-3', LMF: 5'-TGGAACAATAATTGSATTATTTACAYT-3', LMR: 5'-AACATATCATATTCCATCCATTTAGATTA-3') y de 1-4 μL de ADN genómico. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Activación a 94°C por dos minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 59°C por 90 seg y extensión a 72 °C por 2 segundos; por último, extensión final a 72 °C por 7 min. Todos los ensayos se realizaron con control negativo.

## Verificación de positivos en geles de agarosa en PCR multiplex

La verificación de amplicones se realizó en geles de agarosa al 1.2%, a 120 volts, 100 mAh y 5 µl del producto de PCR. La tinción del gel se realizó con SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) mediante adición al gel en una concentración de 1X. Debido a que se generaron muchas bandas inespecíficas se procedió a realizar una PCR anidada.

#### PCR anidada

Para el primer ciclo de la PCR anidada utilizaron los primers HaemNFI se (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAA y ATACCATTC3'). La PCR se realizó en 20 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C por 30 segundos., 50°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos. Previo a la PCR se desnaturalizó el ADN a 94°C por 2 min y al final se realizó una extensión final a 72°C por 7 minutos. Posteriormente, se primers (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') y HaemF (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'). La segunda PCR se realizó en 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C por 30 segundos., 50°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos. Las concentraciones de los reactivos de la PCR anidada fueron: 1X JumpStart<sup>TM</sup> REDTaq® ReadyMix<sup>TM</sup> Reaction Mix y 0.4 μM de cada primer y de 1-4 μL de ADN genómico.

Verificación de positivos en geles de agarosa para PCR anidada

La verificación de amplicones se realizó en geles de agarosa al 1.2%, a 120 volts, 100 mAh y 5 µl del producto de PCR. La tinción del gel se realizó con SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) mediante adición al gel en una concentración de 1X. Debido a que se generaron muchas bandas inespecíficas se procedió a realizar una PCR anidada.

#### 10.2 Análisis de datos

Se evaluó la adecuación de la muestra trazando una curva de acumulación de especies utilizando la función *specaccum* y el método *random*. Este método clásico encuentra la curva de acumulación de especies promedio y su desviación estándar a partir de permutaciones aleatorias de los datos, o submuestreo sin reemplazo. La riqueza total de potenciales vectores de malaria esperada para el área se estimó mediante la función *specpool* utilizando el estimador Bootstrap. Esta función proporciona una estimación única para una colección de sitios de muestra. Para obtener la curva y los valores de riqueza esperados, se utilizaron los datos de registro de potenciales vectores por sitio de estudio, utilizando cada trampa (BG y CDC) de cada muestreo como muestras independientes. Ambos análisis se realizaron en el paquete Vegan de R (R Core Team, 2021).

Se calculó la abundancia relativa de cada especie a partir del número de mosquitos y otros potenciales vectores capturados en cada ambiente y sitio muestreado, y se obtuvieron índices de diversidad. Se utilizó el índice de Shannon para determinar la diversidad, ya que toma en cuenta la riqueza y abundancia de las especies. También se estimó el índice de dominancia de Simpson, que analiza el equilibrio entre los valores de riqueza y abundancia de especies Los análisis de diversidad se realizaron en el paquete *BiodiversityR* (Kindt et al., 2005).

Se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS), basado en distancia euclidiana, para comparar la composición de las comunidades de mosquitos y potenciales vectores de malaria aviar entre los sitios de estudio y por tipo de uso de suelo evaluado (urbano y rural). Cada una de las trampas de muestreo (BG-Sentinel y CDC de luz) se tomó como réplica para cada sitio de muestreo previamente clasificado como área urbana o rural.

Para comprar la composición de las comunidades de mosquitos y potenciales vectores de malaria aviar entre los sitios de estudio y por tipo de uso de suelo evaluado (urbano y rural) se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS). Para ello, cada una de las trampas de muestreo (tanto BG-Sentinel como CDC de luz) se tomó como réplica para cada sitio de muestreo previamente clasificados como áreas urbanas o rurales. Todos los análisis se realizaron en R (R Core Team, 2021).

#### 11 Resultados y discusión

#### 11.1 Resultados:

#### 11.1.1 Familia de insectos potenciales vectores de malaria aviar registradas

Colectamos 312 muestras de insectos usando trampas BG y CDC. A partir de estas colectas obtuvimos 105 muestras (separadas en viales según sitio y especie, género o morfoespecies) con un total de 1259 individuos pertenecientes a las familias Culicidae, Ceratopogonidae y Simulidae. Para este estudio no registráramos individuos de la familia Hippoboscidae.

De las 105 muestras, la mayoría de individuos (94% o 1181) pertenecen a la familia Culicidae, solo un bajo porcentaje (6% o 74 individuos) a Ceratopogonidae y 4 individuos (4%) a la familia Simulidae.

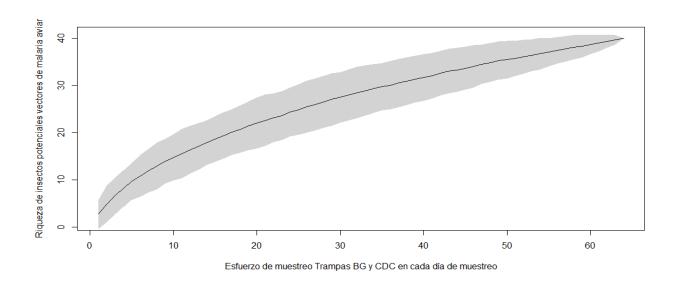
A partir de las muestras analizadas con herramientas moleculares identificamos once especies potenciales vectores de malaria aviar en el área de estudio (Cuadro 1). De estas, *Culex pipiens* Linnaeus y *Aa. aegypti* Linnaeus, 1762 fueron las más abundantes en relación al total de individuos de interés capturados. Las especies *Ae. aegypti*, *Cx. pipens*, *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820) y *Haemagogus janthinomys* (Dyar, 1921) se registraron de cuatro a más municipios muestreados; el resto se registraron en dos o tres de los municipios que formaron parte del estudio.

Además, registramos cinco morfoespecies del género *Culex* y una morfoespecie del género *Bezzia*, de la familia Ceratopogonidae. Por otro lado, también registramos varias morfoespecies de Ceratopogonidae cuyo género no pudo ser identificado y varias morfoespecies de Culicidae.

**Cuadro 1.** Géneros y especies de insectos potenciales vectores de malaria aviar registrados por sito de estudio. PRND = PRM Niño Dormido, RNPH = Reserva Heloderma, PREC = Parque Regional Municipal El Castillo, FLE = Finca Los Encuentros, FEP = Finca Emerio Portillo, FAS = Finca Adrián Salguero, FCV = Finca Vargas, PC = Pueblo Cabañas y FZ = Finca Zacapa.

| N  | Fam ilia        | Especie o morfoespecie                           | FLE | FAS | FZ | FCV | PRE C | PRND | PC  | RNPH | FEP | Total |
|----|-----------------|--|-----|-----|----|-----|-------|------|-----|------|-----|-------|
| 1  | Ceratopogonidae | Bezzia sp.                                       | 8   |     |    |     |       |      |     | 12   |     | 20    |
| 2  | Ceratopogonidae | Ceratopogonidae spl                              |     | 2   | 9  |     | 5     |      |     |      |     | 16    |
| 3  | Ceratopogonidae | Ceratopogonidae sp2                              |     |     | 8  |     |       |      |     | 10   |     | 18    |
| 4  | Ceratopogonidae | Ceratopogonidae sp3                              |     |     |    |     | 0     |      |     |      |     | 0     |
| 5  | Ceratopogonidae | Ceratopogonidae sp4                              | 10  |     |    |     |       |      |     |      |     | 10    |
| 6  | Ceratopogonidae | Ceratopogonidae sp5                              |     |     |    |     |       | 1    |     |      |     | 1     |
| 7  | Ceratopogonidae | Ceratopogonidae sp6                              |     |     |    | 3   |       |      |     |      | 1   | 4     |
| 8  | Ceratopogonidae | Culicoides sp1                                   |     |     |    |     |       |      |     |      | 1   | 1     |
| 9  | Ceratopogonidae | Culicoides sp2                                   |     |     |    |     | 4     |      |     |      |     | 4     |
| 10 | Culicidae       | Aedes aegypti Linnaeus, 1762                     | 2   | 30  | 39 |     |       |      | 102 |      | 3   | 176   |
| 11 | Culicidae       | Aedes albopictus Eskuse 1895                     | 7   | 13  |    |     |       |      | 2   |      |     | 22    |
| 12 | Culicidae       | Aedes spp  | 52  | 17  | 59 |     | 3     | 6    | 29  | 5    |     | 171   |
| 13 | Culicidae       | Anopheles albimanus Wiedemann,<br>1820           | 14  | 1   |    |     | 1     |      | 4   |      | 1   | 21    |
| 14 | Culicidae       | Anopheles pseudopunctipennis<br>Theobald, 1901   |     |     |    | 1   |       |      |     |      |     | 1     |
| 15 | Culicidae       | Coquillettidia nigricans Coquillett,<br>1904     |     | 2   |    |     |       |      |     |      |     | 2     |
| 16 | Culicidae       | Culex pipiens Linnaeus                           |     | 76  | 71 | 41  |       |      | 1   | 1    | 125 | 315   |
| 17 | Culicidae       | Culex quinquefasciatus Say, 1823                 |     | 29  |    | 13  |       |      | 16  |      |     | 58    |
| 18 | Culicidae       | Culex spl  |     |     |    |     |       | 4    |     |      |     | 4     |
| 19 | Culicidae       | Culex sp2  |     |     |    |     |       |      |     |      | 46  | 46    |
| 20 | Culicidae       | Culex sp3  |     |     |    |     |       |      |     | 1    |     | 1     |
| 21 | Culicidae       | Culex sp4  |     |     |    |     |       | 1    |     | 1    |     | 2     |
| 22 | Culicidae       | Culex sp5  |     |     |    |     |       | 4    |     |      |     | 4     |
| 23 | Culicidae       | Culex spp  | 24  | 67  | 37 |     | 60    |      | 29  | 2    |     | 219   |
| 24 | Culicidae       | Haemagogus albomaculatus Theobald,<br>1903       |     |     |    |     |       |      |     |      | 4   | 4     |
| 25 | Culicidae       | Haemagogus jarthinomys Dyar, 1921                | 9   | 1   | 1  |     | 16    |      | 1   |      | 44  | 72    |
| 26 | Culicidae       | Ochlerotatus taeniorhynchus<br>(Wiedemann, 1821) |     |     | 20 |     |       |      |     |      | 1   | 21    |
| 27 | Culicidae       | Sabethes chloropterus von Humboldt,<br>1819      | 1   |     |    |     | 1     |      |     | 1    |     | 3     |
| 28 | Culicidae       | Culicidae spl                                    |     |     |    |     |       | 1    | 3   | 2    |     | 6     |
| 29 | Culicidae       | Culicidae sp2                                    |     |     |    |     |       |      | 1   |      |     | 1     |
| 30 | Culicidae       | Culicidae sp3                                    |     |     |    |     | 7     |      |     | 1    |     | 8     |
| 31 | Culicidae       | Culicidae sp4                                    |     | 4   |    |     | 14    |      |     |      |     | 18    |
| 32 | Culicidae       | Culicidae sp5                                    |     | 1   |    |     | 2     |      |     |      |     | 1     |
| 33 | Culicidae       | Culicidae sp6                                    |     |     | 1  |     |       |      |     |      |     | 1     |
| 34 | Culicidae       | Culicidae sp6                                    |     |     | 1  |     | 2     |      |     |      |     | 2     |
| 35 | Simulidae       | Simulidae sp1                                    | 2   |     |    |     |       |      |     |      |     | 2     |
| 36 | Simulidae       | Simulidae sp2                                    |     |     |    |     |       |      | 2   |      |     | 2     |

La curva de acumulación de especies que obtuvimos no alcanzó la asíntota al final del período de colecta de datos en campo y tomando en cuenta todas las muestras obtenidas con las trampas BG-Sentinel y CDC-light (Fig. 2). El estimador de riqueza total señaló que la riqueza para el lugar es de 47 especies (±2.42).



**Figura 2.** Curva de acumulación de especies de insectos potenciales vectores de malaria aviar por muestra en el área de estudio.

## 11.1.2 Prevalencia malaria aviar en insectos potenciales vectores registrados

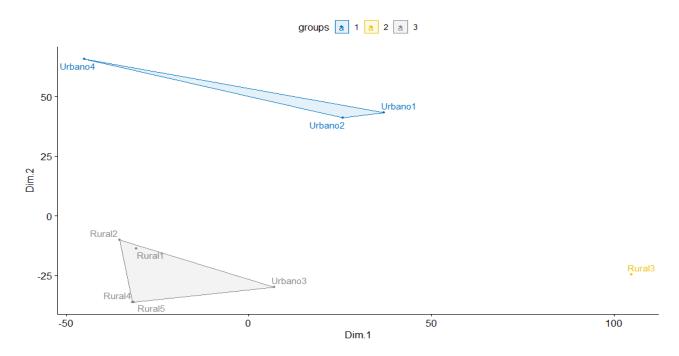
En este estudio, el 100% (90 muestras) de pools de insectos analizados resultaron negativos para la presencia de *Plasmodium*, *Haemoproteus* o *Leucocytozoon*.

# 11.1.3 Prevalencia de hemosporidios en potenciales vectores de malaria aviar según tipo de uso de suelo

Debido a que todas las muestras de insectos analizadas fueron negativas para la presencia de los parásitos de malaria aviar no se pudieron estimar valores de prevalencia por tipo de uso de suelo.

## 11.1.4 Riqueza de insectos potenciales vectores según tipo de uso de suelo

El análisis de escalamiento multidimensional (MDS) indica que la composición de insectos potenciales vectores de malaria aviar indican que los sitios de uso más rural tienen una composición más similar mientras que los sitios más urbanos tiene una comunidad de mosquitos distinta (Figura 2).



**Figura 3.** Análisis de escalamiento multidimensional (MDS) sobre la composición de potenciales vectores de malaria aviar según tipo de uso de suelo. Los nombres señalan las réplicas para cada tipo de uso de suelo (urbano o rural) y los rombos (y colores de los nombres de las réplicas) señalan las agrupaciones obtenidas.

## 11.1.5 Diversidad y Similitud de comunidad de insectos potenciales vectores según uso del suelo

En este estudio, registramos 33 especies (y morfoespecies) en áreas rurales y 24 en áreas urbanas. Los índices de diversidad arrojaron valores distintos para la composición de insectos potenciales vectores de malaria aviar entre sitios de muestreo. Los valores más altos de dominancia se registraron en la Finca Salguero y Finca Zacapa y los más bajos en la Finca Vargas y Finca Portillo. Por su parte, los resultados indican que la Finca Salguero, la Reserva Natural Heloderma y la Finca Los Encuentros, presentan los valores más altos de diversidad de especies (H).

Cuadro 2. Valores de riqueza y diversidad [índice de Simpson (S) e índice de Shannon (H)] para los sitios de muestreo del estudio.

| N | Sitio                | Número de especies, géneros y/o<br>morfoespecies | S    | Н    |
|---|----------------------|--|------|------|
| 1 | PRM El Castillo      | 12   | 0.70 | 1.70 |
| 2 | Finca Los Encuentros | 10   | 0.77 | 1.80 |
| 3 | Finca Salguero       | 12   | 0.83 | 2    |

| 4 | Finca Zacapa     | 10 | 0.81 | 1.86 |
|---|------------------|----|------|------|
| 5 | Finca Vargas     | 4  | 0.44 | 0.83 |
| 6 | Finca Portillo   | 9  | 0.61 | 1.21 |
| 7 | PRM Niño Dormido | 6  | 0.79 | 1.72 |
| 8 | Pueblo Cabañas   | 11 | 0.65 | 1.44 |
| 9 | RNP Heloderma    | 10 | 0.78 | 1.81 |

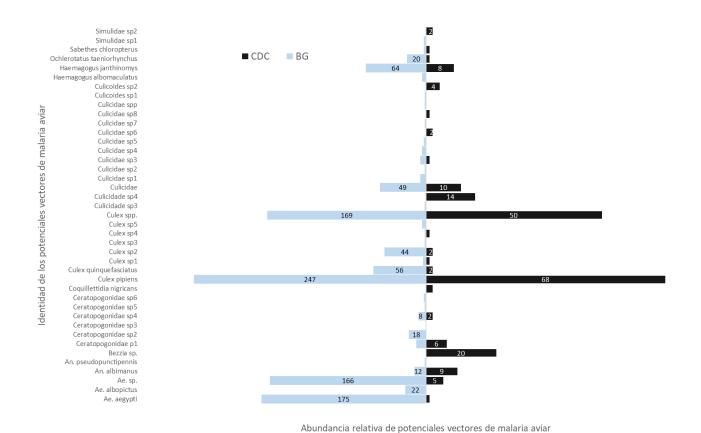
## 11.1.6 Eficiencia de trampas BG y CDC

En este estudio, las trampas BG-Sentinel capturaron mayor número total de insectos de la familia Culicidae en comparación con las trampas CDC light (Cuadro 2). Para las otras dos familias de insectos ambos métodos capturaron similar número de individuos (Cuadro 2).

Cuadro 3. Número total de insectos pertenecientes a tres familias de potenciales vectores de malaria aviar capturados usando trampas BG y CDC de luz en el departamento de Zacapa.

| Tipo de trampa | Ceratopogonidae | Culicidae | Simuliidae | TOTAL |
|----------------|-----------------|-----------|------------|-------|
| BG             | 41              | 1002      | 2          | 1105  |
| CDC            | 33              | 179       | 2          | 214   |
| TOTAL          | 74              | 1181      | 4          | 1319  |

Con algunas excepciones, las trampas BG Sentinel capturaron más del doble de individuos para las distintas especies (o morfoespecies) de culícidos registradas en el estudio (Figura 3). Sin embargo, las trampas CDC-light parecen ser más exitosas para capturar géneros de insectos de otras familias como *Bezzia* de la familia Ceratopogonidae.



**Figura 4.** Número total de individuos de distintos grupos de insectos potenciales vectores de malaria aviar que fueron capturados empleando trampas BG sentinel y CDC light en el estudio.

#### 11.2 Discusión de resultados

#### 11.2.1 Familias de vectores potenciales vectores de malaria aviar registradas

En este estudio registramos individuos de tres de las cuatro familias de insectos que se reportan como vectores de malaria aviar para América (Santiago-Alarcon, Palinauskas, et al., 2012): Culicidae, Ceratopogonidae y Simuliidae. La familia mejor representada con varias especies y gran número de individuos fue Culicidae. Las otras dos familias registraron pocas especies (y/o morfoespecies) e individuos. Esto era de esperarse pues la familia Culicidae es muy diversa y pueden llegar a ser muy abundantes en sus áreas de distribución y en los sitios donde se reproducen (Santiago-Alarcón, Palinauskas, et al., 2012). Este listado de especies constituye el listado más completo hasta el momento sobre la diversidad de potenciales vectores de malaria aviar y otras enfermedades vectoriales en el departamento de Zacapa.

#### Familia Ceratopogonidae

Durante el estudio registramos varios individuos de la familia Ceratopogonidae, una familia de insectos que incluye varios géneros de importancia médica y veterinaria, como *Austroconops* spp.,

Culicoides spp., Forcipomyia spp. Culicoides y Leptoconops spp., cuyas hembras hematófagas se alimentan de sangre de vertebrados, incluyendo humanos (Cazorla-Perfetti, 2014). En este estudio registramos dos géneros, Culicoides y Bezzia. El género Culicoides, comúnmente llamados jejenes, son insectos mordedores con alrededor de 272 especies a nivel mundial; de las cuales al menos 13 especies han sido reportadas para Guatemala (Zulia et al., 2009). Muchas de estas especies tienen importancia sanitaria tanto por las lesiones que ocasionan al morder (que pueden resultar en infecciones en la piel) como por ser transmisores de varios patógenos (Barahona, 2013; Zulia et al., 2009), incluyendo la malaria (Santiago-Alarcon, Havelka, et al., 2012). En el caso del género Culicoides, algunos estudios han detectado que son vectores de distintos linajes de parásitos del género Haemoproteus en diferentes partes del mundo (Inumaru et al., 2023) por lo que tienen potencial para transmitir estos parásitos en la región.

Los insectos del género *Bezzia*, son ceratopogonidos ampliamente distribuido en el mundo representados por al menos 46 especies en el neotrópico. En Guatemala el género ha sido reportado para otros departamentos como Petén (García Soto, 2009). Este género en particular no ha sido señalado directamente como vector de malaria aviar, y en el caso de este estudio los individuos analizados resultaron negativos para la presencia de los parásitos.

Además de varios individuos del género *Bezzia y Culicoides*, registramos seis morfoespecies más de la familia Ceratopogonidae, que se diferenciaron entre sí en su tamaño, color y estructuras adicionales en cabeza, tórax y abdomen. Todos los individuos de esta familia registrados para el estudio no pudieron ser identificados hasta especie debido a que la morfología de este grupo es compleja y a que el porcentaje de identidad que obtuvimos para varios individuos analizados fue muy bajo después de comparar las secuencias con las del GENBANK. Generalmente, la morfología externa e interna ha sido la principal herramienta para identificar las especies de esta familia, pero se requiere de un entomólogo especializado en el grupo para tener certeza de la identificación. Además, debido a que en este grupo también existen complejos de especies es necesario recurrir a herramientas complementarias como la morfometría geométrica y las de tipo molecular con cebadores específicos para este grupos (Cazorla-Perfetti, 2014). El que se haya encontrado bajo porcentaje de identidad de estas secuencias con otras del GENBANK pueda deberse además a que existen pocas secuencias de estas especies cargadas en esa base.

#### Familia Culicidae

La familia Culicidae está formado 3,500 especies distribuidas en dos subfamilias (Anophelinae y Culicinae) y 41 géneros (Foster y Walker, 2019). Aproximadamente el 75% de estas especies se distribuyen en las regiones tropicales y subtropical del mundo (Becker et al., 2019). Para Guatemala se han reportado al menos 139 especies (Darsie, 1994). En este estudio, registramos once especies del grupo, muchas de las cuales están relacionadas con la transmisión de gran número de enfermedades arbovirales (e.j. *Ae. aegypti, Ae. albopictus* como principales vectores de dengue, chikungunya y Zika o *Sabethes chloropteru* como vectores de la fiebre amarilla) (Darsie, 1994). Además, este grupo de insectos constituye el conjunto más importante de vectores de malaria

humana y animal. Por ejemplo, esta familia incluye a los principales vectores de parásitos del género *Plasmodium*: *Culex*, *Aedes*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Aedeomy*a y *Coquillettidia* (Valkiūnas, 2004; Njabo et al., 2011).

#### Familia Simuliidae

Para este estudio reportamos únicamente dos morfoespecies de esta familia de insectos. Los Simuliidae son un grupo poco diverso pero que incluye principalmente especies con hembras que se alimentan de sangre; por lo que su potencial como transmisor de malaria y otros patógenos sanguíneos es alta. Esta familia tiene género de interés particular que se han asociado a transmisión de malaria, incluyendo *Cnephia*, *Prosimulium* y *Simulium* (Santiago-Alarcon, Palinauskas, et al., 2012). En el departamento de Zacapa, los datos indican que estos insectos son poco comunes, aunque sería necesario continuar tomando y analizando datos sobre potenciales vectores con el fin de entender mejor su abundancia y distribución en la región del oriente del país. Además, los individuos que se registraron en este estudio estuvieron presentes en áreas rurales y urbanas por lo que su estudio implicaría muestrear ambos tipos de hábitat.

### Familia Psychodidae

Durante este estudio también capturamos gran cantidad de individuos de la familia Psychodidae. Aunque esta no es una familia transmisora de malaria aviar posee especies relevantes en salud pública y animal. Por ejemplo, en este estudio pudimos identificar la presencia del género *Nyssomyia* a los que se les atribuye participación en la transmisión efectiva de la *Leishmania* sp. (Carvalho et al., 2015). La leishmaniasis es endémica en Guatemala principalmente en su presentación cutánea (Chang et al., 2021) y la prevalencia en el humano a aumentado al doble para el año 2019 (6.9%) en comparación con los casos diagnosticados en el año 2015 (3.7%) (Pérez et al., 2020). Investigaciones realizadas en el país, enfocan sus esfuerzos en la toma de medidas de diagnóstico y prevención de esta enfermedad (Mendizábal-Cabrera et al., 2021). Debido a nuestros hallazgos, sabemos de la presencia de estos potenciales vectores de la enfermedad que alertan la posibilidad de contagio de esta enfermedad. Además, es importante tomar en cuenta que los métodos de muestreo que empleamos no solo permiten capturar gran variedad de zancudos y mosquitos si no otros insectos que actúan como vectores de distintos parásitos patógenos.

#### 11.2.2 Riqueza de insectos potenciales vectores registrados en el área de estudio

La riqueza de insectos potenciales vectores y en particular de Culicidae reportados en este estudio fue relativamente alta tomando en cuenta que el área de estudio está ubicada en una región cálida y seca y que los muestreos se realizaron únicamente durante cinco meses. En este estudio, reportamos once especies de mosquitos (además de varias morfoespecies del grupo). En comparación, un estudio realizado en el departamento de Petén, un departamento con condiciones climáticas más húmedas y adecuadas para la reproducción de mosquitos, reportó 30 especies (Diéguez-Fernández et al., 2006). La riqueza reportada en este estudio es alta en comparación con este último estudio si se

toma en cuenta que el estudio en Petén incluyo tres años de colecta y se realizó en un área de mayor dimensión.

La presencia de una importante riqueza de potenciales vectores de malaria aviar en el lugar puede atribuirse la rica fauna de vertebrados (incluyendo al humano) que se encuentra en el lugar, a la presencia de ríos y quebradas que atraviesan muchos de los sitios de estudio, y a los niveles de urbanización y presencia de asentamientos humanos que garantizan un abundante suministro de hábitats larvales para mosquitos y refugios y fuentes de alimento para estos insectos (De-Carvalho et al., 2014).

Por otro lado, la evaluación sobre la adecuación de la muestra para registrar la riqueza de insectos potenciales vectores de la enfermedad en el área indicó que aún hace falta registrar cierto número de especies para la región de estudio. Esto será posible si se continúan los muestreos en el área, incluyendo otros potenciales sitios de colecta y empleando ambos métodos de muestreo empleados en este estudio.

#### 11.2.2.1 Riqueza de especies de Culicidae

Para este estudio registramos 11 especies de culícidos y 12 morfoespecies de la familia. Además, varios individuos del complejo *Culex* spp. que fueron bastante abundantes pero cuya identidad no pudo determinarse con exactitud empleando rasgos morfológicos o moleculares. A pesar de no poderse identificar hasta especie, los individuos de este complejo se incluyeron en los cuadros y distintos análisis pues representan importantes vectores de malaria aviar animal y humana en todas partes del mundo.

Del género *Aedes* reportamos dos de las especies de mayor interés a nivel mundial, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Estas dos especies invasores, originarias de África, están vinculadas en la transmisión de malaria aviar y varios virus como el zika, chikungunya, fiebre amarilla y dengue (Ostrom, 1990). Este último arbovirus es uno de los más comunes y ampliamente distribuido en el Guatemala. Ambas especies han sido registradas para el país, aunque *Ae. aegypti* parece tener una distribución más amplia. La primera ha sido registrada para 21 departamentos del país y *Ae. albopictus* solo para 11. Nuestros reporte constituye un registro nuevo para el departamento de Zacapa (Lepe et al., 2017). La información generada en este estudio por lo tanto permite conocer mejor la distribución real de esta especie en el país. Además, al ser información apoyada con datos moleculares la certeza del reporte es mayor.

En su estudio, Lepe y colaboradores (2017) sugieren que la distribución de *Ae. aegypti* está asociada a tierras bajas con buena tolerancia a temperaturas elevadas, mientras que *Ae. albopictus* parece preferir zonas más secas en localidades a mayor altitud (2,301 msnm). Sin embargo, estos mismos autores indican que estos dos factores no son necesariamente determinantes de la ocurrencia de las especies. El presente estudio muestra que ambas especies pueden encontrarse en ambientes a baja altitud y condiciones cálidas y secas. Estos son datos que incrementan la comprensión de los factores asociados a la distribución de estas especies. En este sentido, varios estudios muestran que estas

especies invasoras tienen la capacidad de desarrollarse en recipientes con poca agua y de adaptarse bien a cambios en el clima y ambiente, por ejemplo, desarrollan resistencia a la desecación lo que les permite sobrevivir por más de seis meses en ambientes no tan favorables. Estas y otras características de su ciclo de vida les permite colonizar amplias áreas geográficas.

En este trabajo, el mosquito *Ae. aegypti* se capturo tanto en sitios urbanos como rurales. Sin embargo, se capturo mayor número de individuos en áreas urbanas incluyendo el centro del municipio de cabañas y en el área periurbana de Zacapa, Zacapa. Algunos estudios han señalado la asociación de este mosquito a centros urbanos y su creciente expansión a este tipo de áreas debido a diversos factores como el aumento en el número de criaderos generados como consecuencia de distintas actividades humanas en la ciudad (e.j. albercas, llantas, floreros, latas y botellas, cisternas, entre otros) (MacKay et al., 2009). Otros factores asociados son la deficiencias en el saneamiento ambiental, insipientes programas de control de vectores, así como el escaso conocimiento sobre la ecología de estos vector cuyo control se hace únicamente empleando químicos sin tomar en cuenta su comportamiento ecológico (Nathan & Knudsen, 1978).

En este estudio registramos dos especies del género *Anopheles*; *An. albimanus* Wiedemann, 1820 y *A. pseudopunctipennis* Theobald, 1901. De estos, *An. albimanus* estuvo presente en mayor número de sitios (5 sitios de muestreo) y se capturaron mayor número de individuos. Esta última especie es considerada como uno de los principales vectores de malaria en humanos en Centro América y el Caribe. Estos son mosquitos generalistas que se alimentan de sangre de diversos vertebrados incluyendo ganado, cerdos, caballos, perros y humanos. No obstante, existe poca información sobre su potencial para transmitir malaria aviar. Sobre esto último, algunos reportes indican que cierto porcentaje de sus presas son aves (OPS, 1996). Por ejemplo, en Honduras, un estudio confirmó que este mosquito ataca a gran variedad de vertebrados y que los bovinos y las gallinas son una de sus principales fuentes de alimento. Esto señala la importancia de esta especie como potencial vector de malaria en aves de corral y silvestres para el área de estudio.

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo registramos varias especies y morfoespecies del género *Culex*. Las especies de este género son los principales vectores de *Plasmodium* aviar (Santiago-Alarcon, Palinauskas, et al., 2012) y, por esta razón, *Culex* spp. se incluyó en nuestro análisis. En particular, el mosquito *Culex pipiens*, es una de las especies de mosquitos de mayor importancia como vector de una gran variedad de enfermedades alrededor del mundo. Esta especie, introducida en América y nativa de África (Harbach, 2012), es un importante transmisor de numerosos patógenos de animales silvestres, ganado y humanos. Los patógenos que transmite incluyen numerosos arbovirus (como el virus del oeste del Nilo) (Kramer et al., 2008), filarias (que atacan canidos y humanas) y protozoos como los de la malaria (Kimura et al., 2010). Esta especie resultó ser la más abundante para el área durante el período de muestreo.

En este estudio también reportamos a *Cx. quinquefasciatus*, también conocido como mosquito doméstico, es una especie distribuida en todo el mundo, incluyendo Guatemala. Esta especie es un vector de enfermedades como el virus del Oeste del Nilo, la encefalitis equina y la filariasis linfática

en humanos y animales. Además, también es vector de otros patógenos tales como *Wuchereria* bancrofti y distintos grupos de hemosporidios que causan malaria aviar (Monzón-Pineda, 2007). Esta especie ha sido señalada como el principal vector de malaria aviar en la isla de Hawái, causando el declive poblacional de varias especias endémicas de esas islas (LaPointe et al., 2005). Al parecer, la asociación de *Cx. quinquefasciatus* con la transmisión de malaria aviar se debe, entre otras cosas, a que muestra cierta preferencia por alimentarse de aves; aunque también se alimenta de humanos. Por lo tanto, en áreas urbanizadas se enfoca en aves, que pueden ser de corral o compañía, y en menor porcentaje en humanos (Monzón-Pineda, 2007). Esto indica que los programas de control para prevención de malaria aviar deben prestar particular atención a esta especie de mosquito.

Además, es una especie que se asocia principalmente a sitios urbanos. En este estudio se registro principalmente en sitios peri-urbanos y urbanos. Este último mosquito es conocido por su capacidad para reproducirse en fuentes de agua estancada y contaminada, como desagües, charcos y recipientes abandonados lo que explica su asociación a sitios urbanizados.

Esta última especie, junto a *C. pipiens*, tendrían que ser objetivos prioritarios en programas de control y vigilancia en la región de oriente por ser abundantes, por tener una amplia distribución, por transmitir diversa enfermedad y debido a su conocida capacidad de adaptación y resistencia a insecticidas y su amplia distribución (Monzón-Pineda, 2007).

Otra especie de especial atención registrada en el área de estudio fue *Coquillettidia nigricans*. Esta es una especie bastante abundante en Centro América (Morrow et al., 2010), aunque para el área de estudio solo se registraron dos individuos en un área periurbana cercana al centro urbano del municipio de Zacapa. Algunos estudios señalan al género (*Coquillettidia*) como vectores de *Plasmodium* spp. en otras partes del mundo (Njabo et al., 2009). Esta es además una especie importante porque muestra cierta preferencia por alimentarse de humanos (sobre otros animales como gallinas o conejos), por lo que su potencial como vector de enfermedades a humanos es mayor.

En este estudio registramos dos especies de *Haemagogus*. Estos son insectos de hábito diurno que habitan principalmente en ambientes selváticos. Su asociación con estos hábitats se debe a la necesidad que tienen de emplear huecos de árboles para reproducirse. Sin embargo, también se ha descrito su capacidad de reproducción en áreas con perturbación antrópica en las que emplean recipientes abandonados o neumáticos para oviposición (Sánchez-Gonzáles et al., 2014). *Haemagogus janthinomys* es un importante vector de enfermedades virales en Sur América y África, y en esta última parte del continente americano es uno de los principales vectores del virus Mayaro y de la fiebre amarilla (Sánchez-Gonzáles et al., 2014). Es considerada además un vector de malaria, pero existen pocos estudios que atiendan su papel como vector de esta enfermedad (Melgarejo-Colmenares et al., 2022).

En este estudio también reportamos a *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) un mosquito ampliamente distribuido en América y que habita principalmente áreas costeras y pantanosas de agua salobre. Sin embargo, tiene alta plasticidad ecológica ya que se puede encontrar en áreas

selváticas como rurales y urbanas (Chan-Chable et al., 2020). Esta es un especie de importancia sanitaria y veterinaria que constituye un importante transmisor del virus de la encefalitis equina venezolana (Brault et al., 2004). Este último virus presenta dos subtipos, uno enzoótica transmitido en hábitats selváticos por mosquitos *Culex spp.* a mamíferos pequeños y el subtipo epidémico/epizoótico (con distintos serotipos identificados), que emergen periódicamente causando brotes que involucran hasta miles de humanos y caballos (Weaver et al., 1996). En América Latina este virus causo epidemias periódicas entre humanos y equinos en desde la década de 1920 hasta los años noventa. Uno de los últimos brotes importantes se produjo en Venezuela y Colombia en 1995, e implicó alrededor de 100,000 personas infectadas. En 1993 y 1996, se produjeron brotes de esta enfermedad en la costa del Pacífico mexicano en Chiapas y Oaxaca. Durante este brote se aislaron varias cepas de cerebros y sueros de caballos y se demostró su estrecha relación genética con sepas enzoóticas aisladas en la costa de Guatemala entre 1968 y 1980. La estrecha relación genética de ambas sepas mostro un mecanismo de surgimiento de nuevas sepas a través de la acumulación de pequeñas mutaciones, cambio en el rango de hospederos y transmisión por distintos vectores (Brault et al., 2004).

El hallazgo de esta especie mediante técnicas moleculares es relevante pues las hembras adultas de esta especie son muy similares en morfología a las de *Coquillettidia nigricans* y *Coquillettidia venezuelensis* (Theobald), ambas presentes en Guatemala (Campos, M, Laurito, 2022), por lo que las personas con poca experiencia suelen confundirlas (Chan-Chable et al., 2020). En nuestro estudio, su identificación se realizó a través de técnicas moleculares por lo que existe certeza sobre su presencia en el lugar.

El mosquito *Ochlerotatus taeniorhynchus* también ha sido señalado como un importante vector del nemátodo parásito *Dirofilaria immitis* que causa dirofilariasis canina (Manrique-Saide et al., 2008) y que provoca problemas del corazón en los perros. Además, puede llegar a infectar a humanos de forma accidental a través de los mosquitos infectados (Barriga, 2002). En Guatemala existen varios reportes de la enfermedad incluyendo Escuintla (Barahona, 2013) y Retalhuleu (Ramos, 2001).

Otro género de vectores de enfermedades registrado en este estudio fue *Sabethes* género miembro de la tribu Sabethini, con alrededor de 435 especies, que viven típicamente en el bosque y quienes en su mayoría están activos durante el día (Harbach, 2007). Se sabe poco sobre la mayoría de las especies de esta tribu, aunque se cree que muchas especies son vectores potenciales de varias enfermedades humanas. *Sabethes* spp se sabe que transmiten virus como el de la fiebre amarilla en ciclos selváticos, y *Sabethes chloropterus* en particular, han sido implicado como importantes vector de este virus en América del Sur (Barrett y Higgs, 2007). También se ha informado que *Sabethes cyaneus*, otra especie de este género, transmite fiebre amarilla (Vasconcelos, 2003).

11.2.3 Riqueza y prevalencia de géneros de hemosporidios presentes en las familias de insectos potenciales vectores identificados en el área de estudio.

En este estudio, todos los análisis diagnostico para determinar presencia de hemosporidios en los insectos colectados resultaron negativos. Sin embargo, sabemos que estos parásitos circulan en las áreas de bosque seco y rurales de Zacapa (Bustamante et al., 2022). Estos resultados negativos podrían deberse a varias razones. Por ejemplo, a pesar de que el análisis de PCR es bastante sensible a la presencia de estos parásitos incluso en bajas parasitemia (Waldenström et al., 2004), podría ser que los individuos analizados presentaran nula o muy baja presencia de parásitos.

En relación a esto último, se sabe que los parásitos causantes de la malaria aviar pueden llegar a causar la muerte de los enfermos agudos, pero en aquellas aves que se recuperan de esa fase, los parásitos pueden utilizar estrategias de letargo para esconderse de la actividad inmune del huésped, saliendo de la circulación sanguínea (Rivero de Aguilar, 2020). En relación a esto, la prevalencia de malaria aviar en el área de bosque seco de Zacapa se estimó en 38%, y los niveles de parasitemia se consideraron "bajos" en más del 90% de los casos (Bustamante et al., Robles, 2022). Estos resultados pueden considerarse lo suficientemente bajos como para reducir la circulación de los parásitos en los vectores. Para estudios de interacción epidemiológica es importante comprender que la persistencia de los parásitos en los vectores, depende estrechamente de la condición de parasitemia en los hospedadores, así como de la prevalencia de la enfermedad en el área de estudio.

En relación a lo anterior, Kimura, Darbro y Harrington, (2020), estimaron la prevalencia de *Plasmodium y Haemoproteus* en vectores presentes en una zona silvestre del noreste de Estados Unidos y reportaron que la prevalencia general es moderadamente baja (11%), Odawa y colaboradores (2022), en su estudio de 10 años reportaron prevalencia del 20%. Por otro lado, En nuestro estudio los resultados negativos a la identificación de parásitos en los vectores podrían deberse a la relación entre el tamaño de la muestra y la actividad de alimentación de los vectores.

Otro factor que podría influir en la falta de registros de parásitos en los mosquitos analizados es el tamaño de muestra. Aunque en este estudio analizamos 90 pools de mosquitos y otros insectos potenciales vectores de malaria aviar, si la prevalencia era muy baja un incremento en el número de insectos analizados podría haber incrementado la probabilidad de registro de muestras positivas.

Por otro lado, hay que toma en cuenta que la elección de métodos de colecta de zancudos, mosquitos y otros vectores para la identificación de parásitos de malaria que pueden portar, impacta en los resultados de laboratorio. Mawejje y colaboradores (2022), sugieren que existe una diferencia significativa en la identificación de parásitos en vectores capturados con trampas de luz (que empleamos en este estudio) y con el método de captura "human landing catches" (HCLs) (que no empleamos en este estudio). Estos autores sugieren que el método HCL sigue siento mejor y el más estándar porque con él es más seguro capturar zancudos y mosquitos que han realizado actividad de alimentación y por lo tanto al extraer su ADN, lograremos captar ADN de los parásitos (Mawejje et al., 2022). Este último método implica que una persona se siente en un lugar y se exponga a la actividad de picadura de los mosquitos mientras que otra cuenta y registra los mosquitos capturados y/o toma muestras de los que se posen en el individuo expuesto. El método HLC es considerado uno de los métodos más precisos para la recolección de mosquitos, especialmente aquellos que

transmiten enfermedades como el dengue, la malaria y el virus del Zika (Abong'o et al., 2021). Sin embargo, a pesar de que el método HLC es bastante preciso, hay preocupaciones éticas sobre la exposición de las personas a la actividad de picadura de mosquitos. Por esta razón, se han desarrollado técnicas alternativas para la recolección de mosquitos, como trampas de luz, BG-Sentinel y atrayentes químicos como los que se emplearon en este estudio.

11.2.4 Prevalencia de géneros de hemosporidios entre áreas naturales y áreas urbanas del sitio de estudio.

A pesar de que en este trabajo no registramos muestras positivas de insectos infectados con hemosporidios, varios estudios han mostrado que la prevalencia de estos parásitos en mosquitos y otros vectores puede variar en relación al tipo de área muestreada. En su trabajo, Valkiuñas y colaboradores (2019) indica que la prevalencia de malaria aviar en mosquitos puede llegar a ser tan alta como 50 % en algunas regiones del mundo y tan bajas como menos del 10%.

En el caso del grado de urbanización, al parecer la prevalencia de hemosporidios en mosquitos y otros vectores varía según si el entorno es rural o es urbano. Esto tiene relación con la respuesta diferencial de los mosquitos que transmiten estos parásitos según el grado de urbanización; algunas especies se adaptan rápidamente a los cambios climáticos y estructurales de su entorno, lo que les permite desarrollarse y proliferar en nuevos hábitats (por ejemplo: contenedores artificiales para la oviposición) y desplazarse hacia áreas que previamente no eran aptas para su supervivencia, mientras que otras más susceptibles desaparecen de estos sitios y permanecen en su hábitat natural (por ejemplo las especialistas de bosque) (Ferraguti et al., 2016; Srisuka, 2022).

Muchas especies de zancudos son afectadas de manera diferencial por la perturbación de los hábitats naturales; por ejemplo, la presencia y abundancia de poblaciones de especies asociadas a bosques conservados suelen disminuir mientras que las especies más generalistas pueden tener la capacidad de colonizar y proliferar en sitios antropizados. En su estudio, McClure y colaboradores (2018) encontraron que la abundancia de *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus* aumentó con la proporción de tierra circundante desarrollada y la disponibilidad de hábitat larvario, que a su vez estaban correlacionados. Sus hallazgos sugirieron que la conversión de hábitats naturales en terrenos residenciales y agrícolas aumenta los hábitats para el crecimiento de larvas de mosquitos, incrementando la abundancia de ambas especies y el aumento del riesgo de enfermedad para los humanos y la vida silvestre (McClure et al., 2018).

En contraste, en algunas situaciones particulares las poblaciones urbanas de mosquitos pueden tener bajas prevalencias de parásitos debido a que pueden ser más pequeñas y más controladas por la presencia de programas de control de plagas. Por ejemplo, un estudio de análisis de cuatro décadas de datos epidemiológicos de malaria aviar en la India encontró que la presencia y abundancia de vectores fue menor durante los períodos iniciales de implementación de programas de control empleando insecticidas y otras medidas sanitarias. Esto tiene por lo tanto también efecto en la dinámica de transmisión de los parásitos entre huéspedes y vectores (Kumar et al., 2021).

Otros autores reportan que la prevalencia de parásitos en vectores de zonas silvestres es bajas en comparación con la situación en zonas urbanas (Martínez-de la Puente, y otros, 2020). Por tanto, si la parasitemia y prevalencia de los parásitos en los hospederos de la zona es baja se esperaría que la prevalencia en mosquitos de los parásitos también fuera baja y ello hiciera más difícil su detección en los mosquitos.

11.2.5 Composición de la comunidad de mosquitos y otros potenciales vectores de malaria aviar según uso del suelo

En este estudio encontramos que la composición de mosquitos entre áreas urbanas y rurales fue distinta. En nuestro estudio, las áreas rurales mostraron mayor riqueza y valores más altos de diversidad que las urbanas. Estos datos son similares a los observados en otros estudios que han señalado que la diversidad de zancudos y otros vectores asociada a bosques conservados, remanentes boscosos, áreas rurales y peri-urbanas es mayor en contraste con los sitios urbanos y áreas agrícolas y ganaderas que presentan una menor diversidad, ya que las primeras se caracterizan por una mayor heterogeneidad ambiental que se traduce en mayor diversidad de recursos alimenticios y sitios para la oviposición (Abella-Medrano et al., 2015; Montagner, Silva y Jahnke, 2018; Audrey et al., 2020; Ortiz et al., 2022; Srisuka et al., 2022).

Los datos también muestran que las áreas urbanas tienen valores más altos de dominancia de especies en comparación con las rurales. Esto último se debe a la presencia de algunas especies de mosquitos dominantes típicos de sitios urbanas como *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*. Esto se debe a que estas especies antropofilicas pueden explotar los recursos que surgen de la actividad humana al máximo, lo que les permite proliferar y convertirse en vectores eficientes de enfermedades humanas en comparación con otras especies más sensibles a la perturbación (Ferraguti et al., 2016; Loaiza et al., 2019; Ortiz et al., 2022).

11.2.6 Eficiencia comparativa de trampas BG Sentinel y CDC light para captura de vectores de malaria y otras enfermedades virales en el área de estudio

En este estudio empleamos trampas BG-Sentinel y CDC para la captura de un espectro más amplio de insectos potenciales vectores de malaria aviar. La trampa BG-Sentinel es un sistema automatizado de captura de insectos diseñado para capturar varios tipos de mosquitos adultos. La trampa utiliza una combinación de olores atractivos y un ventilador para atraer mosquitos y capturarlos en una red para su posterior análisis. El BG-Sentinel se ha utilizado en varios proyectos de investigación para estudiar las poblaciones locales de mosquitos y evaluar la eficacia de diversas estrategias de control de mosquitos. Po ejemplo, estas son las que se emplean comúnmente en el muestreo de especies relevantes y de importancia regional como *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*, adultos. Por su parte, la trampa CDC (desarrollada por el Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC)), fue diseñada para ser más eficiente que las trampas tradicionales para atraer y atrapar mosquitos, particularmente aquellos que transmiten enfermedades como el virus del Nilo Occidental y el virus Zika. La trampa utiliza una fuente de luz, ya sea incandescente o LED, para

atraer a los mosquitos y un ventilador para atraerlos a una red de recolección. La fuente de luz es alimentada por electricidad o baterías.

A pesar de que las trampas CDC se diseñaron para mejorar la captura de insectos culícidos, en este estudio encontramos que las trampas BG-Sentinel son mucho más efectivas para capturar mayor número de mosquitos y otros potenciales vectores de malaria aviar en el área de estudio. Este dato es útil pues conocer la eficiencia de distintas herramientas de captura de vectores es indispensable para establecer adecuadas estrategias de vigilancia y control de vectores adultos.

La eficiencia de las trampas para capturar insectos también puede estar relacionada con la especie de mosquito o insecto que se desee capturar. En algunos casos algunos tipos de trampas serán más eficientes que otros según la biología y comportamiento de las especies. Por ejemplo, en su estudio Monzón-Pineda (2007) no encontró diferencia significativa entre el número de individuos de *Cx. quinquefasciatus* capturados con dos tipos de trampas (CDC y grávida). Encontró la misma eficiencia en ambas trampas.

#### **Conclusiones**

En este estudio registramos tres de las cuatro familias de insectos que se reportan como vectores de malaria aviar para América, Culicidae, Ceratopogonidae y Simuliidae. La familia mejor representada con varias especies y gran número de individuos fue Culicidae. Esta familia fue además la mejor distribuida por lo que su potencial como transmisores de malaria aviar en el área es la más alta.

Los análisis genéticos y ecológicos que llevamos a cabo muestran la importante riqueza de insectos potenciales vectores de malaria aviar en el departamento de Zacapa. Estos datos junto a otros reportes sobre la capacidad vectorial de algunas de las especies registradas, permiten concluir que en varias zonas del departamento de Zacapa se pueden presentar brotes de malaria aviar en aves silvestres y de corral y de algunas arbovirosis que pueden ser transmitidos por estos vectores. Este hallazgo, muestra la importancia de profundizar estudios en el país sobre la distribución geográfica y ecología de mosquitos vectores y su posible relación con enfermedades emergentes y reemergentes en el país y la región.

La diversidad y abundancia de mosquitos en el área de estudio fue relativamente alta, para ser una zona cálida y seca y haberse muestreado por un período relativamente corto. Esto posiblemente este relacionado con el nivel de perturbación antrópica que predomina en la región y debido a la presencia de distintos cuerpos de agua que proporcionan diversos recursos para la reproducción y alimentación de estos insectos.

Los datos generados en este estudio apoyan la recomendación de otros estudios para el uso de trampas BG-Sentinel como principal herramienta de muestreo en programas de vigilancia de mosquitos, y otros potenciales vectores de malaria aviar en la región.

Diversos factores determinantes en el mantenimiento del ciclo de transmisión de la malaria aviar y otras enfermedades víricas en la zona, como alta riqueza de potenciales vectores, asentamientos

humanos, presencia de alta diversidad de aves silvestres y zonas boscosas periféricas a las zonas residenciales, indican la necesidad de medidas de vigilancia. Se sugiere la recolección sistemática de mosquitos adultos para aislar parásitos como los de la malaria, así como la vigilancia serológica en humanos y animales domésticos y selváticos involucrados en los ciclos de transmisión de enfermedades zoonóticas.

### 12 Referencias

- Abong'o, B., Gimnig, J. E., Longman, B., Odongo, T., Wekesa, C., Webwile, A., Oloo, B., Nduta, M., Muchoki, M., Omoke, D., Wacira, D., Opondo, K., Ochomo, E., Munga, S., Donnelly, M. J., & Oxborough, R. M. (2021). Comparison of four outdoor mosquito trapping methods as potential replacements for human landing catches in western Kenya. *Parasites and Vectors*, 14(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04794-3
- Arocha-López, R. (2019). Determinación de la presencia de Hemoprotozoarios, a través del método de frote sanguíneo en gallinas de traspotio y reproductoras de granja en el municipio de Sanarate, Departamento de El Progreso, en el período de abril a julio, 2018. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Atkinson, C. T., Woods, R. J., Dusek, L., Sileo, S., & Iko, M. (1995). Wildlife Disease and Conservation in Hawaii: Pathogenicity of Avian Malaria (Plasmodium Relictum) in Experimentally Infected Iiwi (Vestiaria Coccinea). *Parasitology*, *111*(S1), S59–S69. https://doi.org/10.1017/S003118200007582X
- Abella-Medrano, C. A., Ibáñez-Bernal, S., Carbó-Ramírez, P., y Santiago-Alarcon, D. (2018). Blood-meal preferences and avian malaria detection in mosquitoes (Diptera: Culicidae) captured at different land use types within a neotropical montane cloud forest matrix. Parasitology International, 67(3), 313-320. https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.01.006
- Barahona, G. (2013). Determinación de la presencia de anticuerpos circulantes de Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi y antígenos circulantes de Dirofilaria immitis, a través de la prueba rápida de Elisa, en perros, del municip.
- Brault, A. C., Powers, A. M., Ortiz, D., Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R., & Weaver, S. C. (2004). Venezuelan equine encephalitis emergence: Enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11344–11349. https://doi.org/10.1073/pnas.0402905101
- Borkent, A. y Brown, B. (2015). How to inventory tropical flies (Diptera) one of the hyperdiverse orders of insects. Zootaxa, 3949 (3), 301–322.
- Bustamante-Castillo, M., Barrios-Izás, M., & De-León, E. (2022). *Malaria en Aves de Traspatio y Silvestres en una región de bosque seco de Guatemala*.
- Campos, M, Laurito, M. (2022). *Culicidae (Diptera) species from Argentina and Uruguay*. Culicidae (Diptera) Species from Argentina and Uruguay. https://biodar.unlp.edu.ar/culicidae/index-es.html
- Carvalho, B., Rangel, E., Ready, P., & Vale, M. (2015). Ecological Niche Modelling Predicts

- Southward Expansion of Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Vector of Leishmania (Leishmania) amazonensis in South America, under Climate Change. *PLOS ONE*, *10*(11), e0143282. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0143282
- Cazorla-Perfetti, D. (2014). Catálogo de las especies de ceratopogonidae (Diptera: Nematocera) registradas para Venezuela y su importancia agro-ecológica y sanitaria. *Saber, Universidade de Oriente, Venezuela*, 26(August 2014), 395–408.
- Chan-Chable, R. J., Martínez-Arce, A., & Mis-avila, P. C. (2020). Especies crípticas en Ochlerotatus taeniorhynchus mediante revelación de código de barras. *Revista Salud Quintana Roo*, *11*(38), 7–11.
- Chang, P., Marroquín, R., Barillas, S., Ovalle, J., & Samayoa, T. (2021). *Vista de Leishmaniasis cutánea en extremidad superior* | *Revista médica*. https://www.revistamedicagt.org/index.php/RevMedGuatemala/article/view/323/463
- Ciloglu, A., Ellis, V. A., Bernotienė, R., Valkiūnas, G., & Bensch, S. (2019). A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites. *Parasitology Research*, *118*(1), 191–201. https://doi.org/10.1007/s00436-018-6153-7
- Cuevas, E., Doussang, D., Cevidanes, A., & Quirici, V. (2020). Hemosporidios aviares y gradientes latitudinales: oportunidades y desafíos en el Cono Sur de América. *Ecosistemas*, 29(2), 1–9.
- Darsie, R. F. (1994). A revised checklist of the mosquitoes of Guatemala including a new country record, Psorophora cyanescens. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(4), 511–514.
- De-Carvalho, G., dos-Santos, R., Izumisawa, C., Souza, R., Natal, L., & Toledo, M. (2014). Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 146–152. https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12081.x
- De La Torre, G. M., Campião, K. M., Bell, J. A., Silva, A. M., & Fecchio, A. (2021). Avian community composition affects ornithophilic mosquito and avian malaria turnover across an interfluvial system in southern Amazonia. *Journal of Avian Biology*, *52*(3). https://doi.org/10.1111/jav.02701
- De León, E. (2019). Determinación de la presencia de hemoparasitos en loros nuca amarilla (Amazona auropalliata) del centro de Rescate y Conservación de Vida Silvestre ARCAS. Guatemala, Guatemala: Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Diéguez-Fernández, L., Avelar-Hernández, C., Zacarías-Pérez, R., & Salazar-Quiroga, V. (2006). Contribución al estudio de la familia Culicidae de Guatemala: relación y distribución geográfica de las principales especies en la región norte (Vol. 58, Issue 1).
- Enayati, A., & Hemingway, J. (2010). Malaria management: Past, present, and future. *Annual Review of Entomology*, 55, 569–591. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085423
- Ferraguti, M. (2017). Biodiversity and vector-borne diseases: effects of landscape, mosquito, and vertebrate communities on the transmission of west Nile Virus and avian malaria parasites. Seville, Spain.: PhD Thesis. Universidad Pablo de Olavide.
- Ferraguti, M., Puente, J. M., Roiz, D., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2018). Ecological

- determinants of avian malaria infections: An integrative analysis at landscape, mosquito, and vertebrate community levels. Journal of Animal Ecology, 87(3), 727-740. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12805.
- García Soto, P. (2009). Distribución de los insectos acuáticos en cuerpos lénticos de la Biosfera Maya: Indicadores biológicos de la calidad del agua. http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puirna/INF-2009-049.pdf
- Gotelli, N. J., & Colwell, R. K. (2001). Quantifying biodiversity: Procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, *4*(4), 379–391. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00230.x
- Harbach, R. E. (2012). Culex pipiens: Species versus species complex Taxonomic history and perspective. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(4 SUPPL.), 10–23. https://doi.org/10.2987/8756-971X-28.4.10
- Jauregui, P. A. (2014). Determinación de la presencia de malaria en aves del zoológico Nacional la Aurora. Guatemala, Guatemala: Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Kindt R, Coe R (2005). Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. World Agroforestry Centre (ICRAF), Nairobi (Kenya). ISBN 92-9059-179-X,
- Kimura, M., Darbro, J. M., & Harrington, L. C. (2010). Avian malaria parasites share congeneric mosquito vectors. *Journal of Parasitology*, 96(1), 144–151. https://doi.org/10.1645/GE-2060.1
- Kumar, R., Prakash, C., & Sharma, A. (2021). Four decades of epidemiological data reveal trajectories towards malaria elimination in Kheda district (Gujarat), western part of India. *BMJ Global Health*, *6*(12). https://doi.org/10.1136/BMJGH-2021-005815
- Lapointe, D. A., Atkinson, C. T., & Samuel, M. D. (2012). Ecology and conservation biology of avian malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1249*(1), 211–226. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06431.x
- Lepe, M., Dávila, M., Canet, M., López, Y., Flores, E., Dávila, A., & Escobar, L. E. (2017). *Distribución de.* 4, 21–31.
- López, A., & José, R. E. (2018). Determinación de la presencia de hemoprotozoarios a través del método de frote sanguíneo en gallinas de traspatio y reproductoras de granja en el municipio de Sanarate, departamento de El Progreso, en el período de abril a julio, 2018. El Progreso, Guatemala: Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Lyimo, I.N. y Ferguson, H.M., (2009). Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors, Trends in Parasitology, 25(4), 189–196. https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.005
- MacKay, A. J., Amador, M., Diaz, A., Smith, J., & Barrera, R. (2009). Dynamics of aedes aegypti and culex quinquefasciatus in septic tanks. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(4), 409–416. https://doi.org/10.2987/09-5888.1
- Manrique-Saide, P., Bolio-González, M., Sauri-Arceo, C., Dzib-Florez, S., & Zapata-Peniche, A. (2008). Ochlerotatus taeniorhynchus: A probable vector of Dirofilaria immitis in coastal areas of Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 45(1), 169–171.

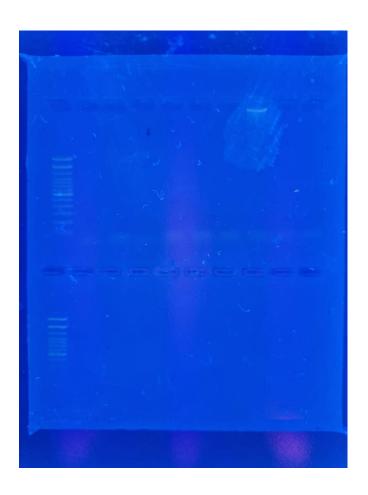
- https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[169:OTAPVO]2.0.CO;2
- Marroquin-Flores, R., Williamson, J., Chávez, A., Bauernfeind, S., Baumann, M., Gadek, C., Johnson, A., McCullough, J., Witt, C., & Barrow, L. (2017). Diversity, abundance, and host relationships of avian malaria and related haemosporidians in New Mexico pine forests. *Peer J.*, *5*(1), 1–8. https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298%0Ahttp://repositorio.unan.e du.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005%0Ahttp://www.biome dcentral.com/1471-2458/12/58%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P
- Martínez-deLaPuente, J., & Ferraguti, M. (2020). Ecología de transmisión de enfermedades : interacciones entre aves, parásitos sanguíneos y vectores. *Ecosistemas*, 2(29), 1–4.
- Mawejje, H. D., Asiimwe, J. R., Kyagamba, P., Kamya, M. R., Rosenthal, P. J., Lines, J., Dorsey, G., & Staedke, S. G. (2022). Impact of different mosquito collection methods on indicators of Anopheles malaria vectors in Uganda. *Malaria Journal*, *21*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12936-022-04413-1
- McClure, K., Lawrence, C., & Kilpatrick, M. (2018). Land use and larval habitat increase Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) abundance in Lowland Hawaii. *Journal of Medical Entomology*, *55*(6), 1509–1516. https://doi.org/10.1093/jme/tjy117
- Melgarejo-Colmenares, K., Cardo, M. V., & Vezzani, D. (2022). Blood feeding habits of mosquitoes: hardly a bite in South America. *Parasitology Research*, *121*(7), 1829–1852. https://doi.org/10.1007/s00436-022-07537-0
- Mendizábal-Cabrera, R., Pérez, I., Becerril Montekio, V., Pérez, F., Durán, E., & Trueba, M. L. (2021). Cutaneous leishmaniasis control in Alta Verapaz (northern Guatemala): evaluating current efforts through stakeholders' experiences. *Infectious Diseases of Poverty*, *10*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s40249-021-00842-3
- Monzón-Pineda, M. de L. (2007). Estudio de la densidad relativa de Culex quinquefasciatus y detección de Flavivirus en zancudos de esta especie capturados en el municipio de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala.
- Morrow, M., Johnson, R., Polanco, J., & Claborn, D. (2010). Mosquito vector abundance immediately before and after Tropical Storms Alma and Arthur, northern Belize, 2008. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 28(1), 19–24. https://doi.org/10.1590/S1020-49892010000700003
- Nathan, M. B., & Knudsen, A. B. (1978). Aedes aegypti infestation characteristics in several community-based control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(3), 3–7.
- Njabo, K. Y., Cornel, A. J., Sehgal, R. N. M., Loiseau, C., Buermann, W., Harrigan, R. J., Pollinger, J., Valkiunas, G., & Smith, T. B. (2009). Coquillettidia (Culicidae, Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. *Malaria Journal*, 8(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-193
- OPS. (1996). Biología y ecología de Anopeles albimanus Wiedemann en Centroamérica. In *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* (Vol. 43).

- https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/15440/v121n3p189.pdf?sequence=1&isAllowed =y
- Ostrom, E. (1990). <Ostrom 1990 Governing the Commons Ch2.pdf>. In Governing the Commons.
- Patz, J.A., Graczyk, T. K., Geller, N. y Vittor, A. Y. (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. International Journal for Parasitology, 30(12-13), 1395-1405. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00141-7
- Pérez, I., Duran, E., Pérez, F., Trueba, M., & Renata, M.-C. (2020). Recomendaciones para el fortalecimiento del control de la leishmaniasis cutánea en Guatemala (Vol. 1).
- Pongsiri, M. J., Roman, J., Ezenwa, V. O., Goldberg, T. L., Koren, H. S., Newbold, S. C., Ostfeld, R. S., Pattanayak, S. K. y Salkeld, D. J. (2009). Biodiversity Loss Affects Global Disease Ecology. BioSience, 59(11), 945-954. https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.11.6
- King, L.J. (2014). Comating the Triple Threat: The Need for a One Health Approach. In: One Health. People, Animals, and the Environment. (eds R.M. Atlas and S. Maloy). American Society for Microbiology (ASM), Washington
- Ramos, L. (2001). Diagnóstico de Dirofiliariasis canina, por medio del método de Knott y ELISA, en el municipio de Champerico del departamento de Retalhuleu, Guatemala. Guatemala: Tesis USAC.
- Rivero, A., & Gandon, S. (2018). Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. *Trends in Parasitology*, 34(8), 712–726. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.06.002
- Salazar, C. H. (2012). Diagnóstico de paludismo aviar en pollos (Gallus gallus) a través de la técnica convencional en el municipio la Gomera, departamento de Escuintla, Guatemala. Guatemala, Guatemala.: Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Sánchez-Gonzáles, E., Jonathan, L., Rodrigo, R., Manuel, M., & Juan-Carlos, N. (2014). Nuevos registros de vectores potenciales de Fiebre Amarilla y Mayaro para el estado Guárico, Venezuela. Primer registro de Haemagogus janthinomys Dyar para los Llanos centrales de Venezuela. *Boletín de Malariologia y Salud Ambiental*, *LIV*(2), 250–253.
- Santiago-alarcon, D. (2020). Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics. In *Avian Malaria* and Related Parasites in the Tropics. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51633-8
- 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. *PLoS ONE*, 7(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031098
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., & Schaefer, H. M. (2012). Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: Untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*, 87(4), 928–964. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/
- Romero-Alvarez, D. y Escobar, L. E. (2017). Vegetation loss and the 2016 Oropouche fever outbreak in Perú. Mem institute Oswaldo Cruz, 112(4), 292.298. https://doi.org/10.1590/0074-02760160415

- Smallegange, R. C., Schmied, W. H., Roey, K. J. Van, Verhulst, N. O., Spitzen, J., Mukabana, W. R., & Takken, W. (2010). Sugar-fermenting yeast as an organic source of carbon dioxide to attract the malaria mosquito Anopheles gambiae. 1–15.
- Triplehorn, C., & Jhonson, N. (2005). Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects (7th ed.).
- Valkiunas, G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia* (Vol. 117, Issue 2). CRC Press. https://doi.org/10.2307/4089719
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., & Östman, Ö. (2004). A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting Plasmodium and Haemoproteus Infections From Avian Blood. *Journal of Parasitology*, 90(1), 191–194. https://doi.org/10.1645/ge-3221rn
- Weaver, S. C., Salas, R., Rico-Hesse, R., Ludwig, G. V., Oberste, M. S., Boshell, J., & Tesh, R. B. (1996). Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. *Lancet*, *348*(9025), 436–440. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)02275-1
- Zulia, U., Gustavo, J., Las, C. D. E., Culicoides, E. D. E., Ceratopogonidae, D., Con, A., En, G., Región, L. A., Ceratopogonidae, D., Con, A., Ganadería, L. A., & Perruolo, G. J. (2009). EN LA REGIÓN NEOTROPICAL.

### 13 Apéndice

**Apéndice 1.** Se presenta la foto de uno de los geles analizados (Gel de agarosa 10 %, tinción con bromuro de etidio) con productos de amplificación de pools de mosquitos y otros insectos de interés.



Apéndice 2. Número de individuos registrados de distintos insectos estudiados por tipo de uso de suelo.

|   |   |       | Tipos de uso de suelo |
|---|---|-------|-----------------------|
| N | familia, especie, género o morfoespecie     | rural | urbano                |
| 1 | Aedes aegypti Linnaeus, 1762                | 5     | 171                   |
| 2 | Aedes albopictus Eskuse 1895                | 7     | 15                    |
| 3 | Aedes sp.                                   | 66    | 105                   |
| 4 | Anopheles albimanus Wiedemann, 1820         | 16    | 5                     |
| 5 | Anopheles pseudopunctipennis Theobald, 1901 |       | 1                     |
| 6 | Bezzia sp.                                  | 20    |                       |

| 7         | Ceratopogonidae sp1                           | 5   | 11  |
|-----------|---|-----|-----|
| 8         | Ceratopogonidae sp2                           | 10  | 8   |
| 9         | Ceratopogonidae sp3                           | 1   |     |
| 10        | Ceratopogonidae sp4                           | 10  |     |
| 11        | Ceratopogonidae sp5                           | 1   |     |
| 12        | Ceratopogonidae sp6                           |     | 2   |
| 13        | Coquillettidia nigricans Coquillett, 1904     |     | 2   |
| 14        | Culex pipiens Linnaeus                        | 126 | 189 |
| 15        | Culex quinquefasciatus Say, 1823              |     | 58  |
| 16        | Culex sp1                                     | 4   |     |
| 17        | Culex sp2                                     | 46  |     |
| 18        | Culex sp3                                     | 1   |     |
| 19        | Culex sp4                                     | 2   |     |
| 20        | Culex sp5                                     | 4   |     |
| 21        | Culex spp.                                    | 86  | 133 |
| 22        | Culicidade sp3                                | 1   |     |
| 23        | Culicidade sp4                                | 14  |     |
| 24        | Culicidae                                     | 2   | 7   |
| 25        | Culicidae                                     | 3   | 47  |
| 26        | Culicidae sp1                                 | 3   | 3   |
| 27        | Culicidae sp2                                 |     | 1   |
| 28        | Culicidae sp3                                 | 7   |     |
| 29        | Culicidae sp4                                 |     | 4   |
| 30        | Culicidae sp5                                 | 2   |     |
| 31        | Culicidae sp6                                 | 2   |     |
| 32        | Culicidae sp7                                 |     | 1   |
| 33        | Culicidae sp8                                 |     | 1   |
| 34        | Culicidae sppx                                |     | 1   |
| 35        | Culicoides sp1                                | 1   |     |
| 36        | Culicoides sp2                                | 4   |     |
| 37        | Haemagogus albomaculatus Theobald, 1903       | 4   |     |
| 38        | Haemagogus janthinomys Dyar, 1921             | 69  | 3   |
| <b>39</b> | Ochlerotatus taeniorhynchus (Wiedemann, 1821) | 1   | 20  |
| 40        | Sabethes chloropterus von Humboldt, 1819      | 3   |     |
| 41        | Simulidae sp1                                 | 2   |     |
| 42        | Simulidae sp2                                 |     | 2   |
|           | TOTALES                                       | 528 | 790 |

Apéndice 5. Fotografías de trabajo de campo y laboratorio del proyecto



insectos potenciales vectores de malaria aviar realizados en el área de estudio.



Muestreo de insectos potenciales vectores de malaria aviar realizados en el área de estudio.



Colocación de trampas BG-Sentinel en sitios de muestreo



Colocación de trampas BG-Sentinel en sitios de muestreo



Colocación de trampas BG-Sentinel en sitios de muestreo



Instalación de trampas CDC para captura de insectos en sitios de estudio



Colocación de trampas BG-Sentinel en sitios de muestreo







Colocación de trampas BG-Sentinel en sitios de muestreo



Colocación de trampas BG-Sentinel y CDC-Light en sitios de muestreo





Colocación de trampas BG-Sentinel en sitios de muestreo









Colocación de trampas BG-Sentinel y CDC-Light en sitios de muestreo











Trabajo de identificación de insectos capturados en laboratorio de entomología de CUNZAC.

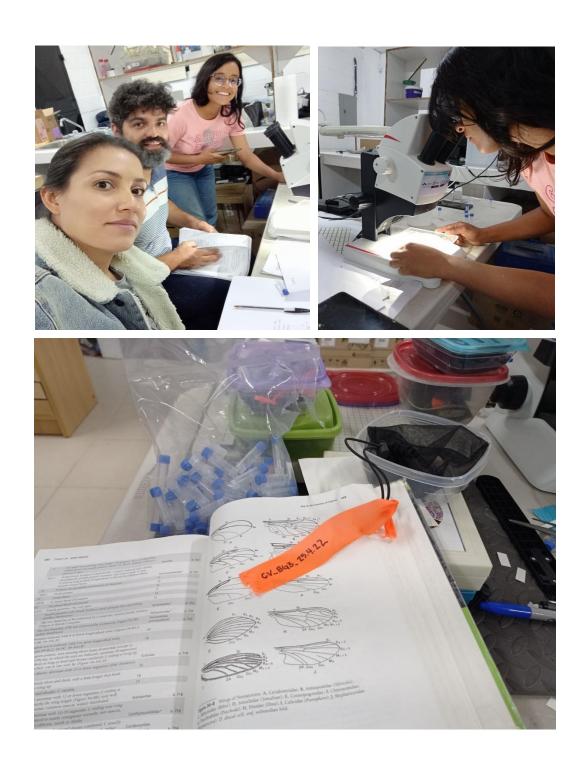




Trabajo de identificación de insectos capturados en laboratorio de entomología de CUNZAC.



Trabajo de identificación de insectos capturados en laboratorio de entomología de CUNZAC.



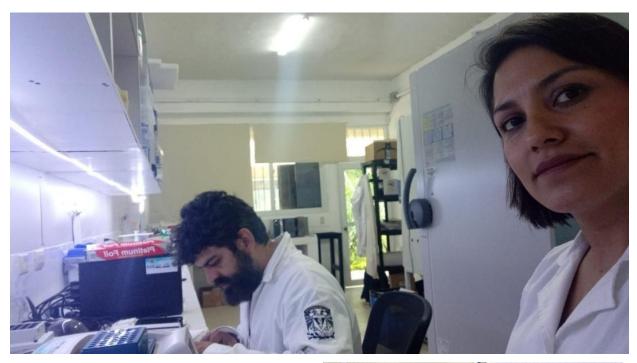
Fotografías del trabajo de laboratorio para clasificar por familia a los insectos potenciales vectores de malaria aviar en el sitio de estudio.



Fotografías del trabajo de laboratorio realizado para estandarizar protocolo de extracción de ADN en insectos potenciales vectores de malaria aviar en el sitio de estudio.



Fotografías del trabajo de laboratorio realizado para estandarizar protocolo de extracción de ADN en insectos potenciales vectores de malaria aviar en el sitio de estudio.







Fotografías del trabajo de laboratorio realizado para estandarizar protocolo de extracción de ADN en insectos potenciales vectores de malaria aviar en el sitio de estudio.



CV\_BG2\_25.04.2022 Anopheles spp.



CV\_BG4\_25.04.2022 Morfoespecie 1. Proboscis corta.

Fotografías de algunos de los insectos potenciales vectores de malaria aviar capturados durante el estudio



CV\_BG4\_25.04.2022 Ceratopogonidae negro. Morfoespecie 4.



CV\_BG4\_25.04.2022 Morfoespecie 2. Negro con armadura negra.



CV BG2 25.04.2022 Ceratopogonidae

### 14 Aspectos éticos y legales (si aplica)

No requirió.

#### 15 Vinculación

Este proyecto vinculo a dos instituciones con enfoque de investigación de enfermedades zoonóticas y dinámica parásito-hospedero (CUNZAC e INECOL). El proyecto contemplo un componente de transferencia de conocimientos entre los investigadores de este proyecto y el laboratorio del Dr. Diego Santiago-Alarcón.

### 16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Con los resultados de este proyecto se ingresó un manuscrito para la revista Ciencia, Tecnología y Salud que describirá la riqueza de potenciales vectores de malaria aviar en la región del oriente del país y el cuál comparará la eficiencia de los dos métodos de muestreo empleados en la captura de distintos vectores de la enfermedad. Los resultados del estudio se presentarán en CONVERCIENCIA 2023 y en al menos un congreso sobre ecología y/o biología y uno de medicina veterinaria. Se presentaron los resultados del proyecto mediante un video corto y un poster que se entregó al IICUNZAC para que sea difundido en las distintas redes sociales.

# Indique concretamente cómo contribuyen los resultados de la investigación al alcance de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

El estudio esta aportando al cumplimiento del objetivo ODS 3 que pretende contribuir a evitar las muertes por enfermedad emergentes por zoonosis, incluida la malaria humana. Este objetivo también busca contribuir a la seguridad alimentaria humana en países en desarrollo.

En esta investigación evaluamos la diversidad de insectos vectores de malaria aviar y malaria humana por lo que esta información podrá emplearse en el desarrollo de programas de control y monitoreo de vectores y sistemas de alerta temprana ante brotes de esta enfermedad en aves de corral o traspatio y a identificar sitios de riesgo de transmisión para estos animales. Esto último, contribuirá a evitar pérdidas económicas y fuentes de alimento para las comunidades asentadas en el área.

Este proyecto también contribuyo con el objetivo ODS 15, Vida de ecosistemas terrestres. Este objetivo indica que deben tomarse medidas urgentes para reducir la pérdida de hábitats naturales y biodiversidad que forman parte de nuestro patrimonio común. Los datos de este proyecto se pueden emplearse para justificar la conservación de áreas naturales o poco perturbadas dentro de la región de estudio pues son áreas que mantienen alta diversidad y que pueden contribuir a disminuir la prevalencia de enfermedades vectoriales en áreas pobladas.

### Declaración del Coordinadora del proyecto de investigación

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

| Dra. Michelle Bustamante Castillo          |       |
|--|-------|
| Coordinadora del proyecto de investigación | Firma |
| Fecha: 28/2/2023                           |       |

## Aval del director del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto (escriba el nombre del proyecto de investigación) en mi calidad de (indique: Director del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

| Vo.Bo. Dr. Manuel Alejandro Barrios Izas,<br>Coordinador<br>Instituto de Investigaciones CUNZAC | Firma |
|---|-------|
| Fecha: 28/02/2023   |       |

### Visado de la Dirección General de Investigación

| Vo.Bo. Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar<br>Programa Universitario de Investigación en Ciencias<br>Básicas | Firma  |
|--|--|
| Fecha: 28/2/2023   | coordinate (seneral de rogramas de<br>Invest <del>igación,</del> Digi-Usac |

### Vo.Bo. Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación



Fecha: 28/2/2023