

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud –PUIIS–

Programa universitario de investigación de la Digi

Malaria en Aves de Traspatio y Silvestres en una región de bosque seco de Guatemala

Nombre del proyecto de investigación

AP3CU-2021

Código del proyecto de investigación

Instituto de Investigaciones del Centro Universitario de Zacapa, Universidad de San Carlos de Guatemala

Unidad académica avaladora

Coordinadora

Dra. Michelle Bustamante Castillo

Equipo de investigación

Dr. Manuel Alejandro Barrios Izás

MSc. Estefany Alejandra de León Robles

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

Zacapa, 28 de febrero de 2022

lugar y fecha de presentación del informe final

Autoridades

Dr. Hugo René Pérez Noriega
Director General de Investigación

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

Dra. Hilda E. Valencia de Abril
Coordinadora Programa Universitario Interdisciplinaria de Investigación en Salud -PUIIS-
DIGI /USAC

Autores

Coordinadora: Dra. Michelle Bustamante Castillo
Investigador: Dr. Manuel Alejandro Barrios Izás
Investigadora: MSc. Estefany Alejandra de León Robles

Citar como: Bustamante-Castillo, M., Barrios-Izás, M. y De-León-Robles, E. (2022). Malaria en Aves de Traspatio y Silvestres en una región de bosque seco de Guatemala. Informe proyecto AP3CU-2021. Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Colaboradores

Marvin Gabriel Antón Pineda.	Estudiantes de Ingeniería Agroindustrial, CUNZAC, USAC.
Michael Eduardo Sasvín Carranza.	Estudiantes de Ingeniería Agroindustrial, CUNZAC, USAC.
Ana Cristina Hernández Solís.	Programa de EPS, Escuela de Biología, Facultad CCQQ y Farmacia, USAC.
Carlos André Chúa Velásquez.	Programa de EPS, Escuela de Biología, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC.
Alicia Elena Eufragio Blanco.	Tesista, Escuela de Biología, Escuela de Biología, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC.
Marta María Espinoza Ciramagua.	Estudiante Licenciatura en Nutrición, CUNZAC, USAC.

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 AP3CU-2021 en el Programa Universitario de Investigación interdisciplinaria en Salud -PUIIS-.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

Agradecimientos

Dra. Lesbia Calderón, MARN

Ing. Lester García, MARN

Inge. José María Figueroa Duarte

Inge. Emerio Portillo

Inge. Adrián Salguero

Acrónimos

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación	-MARN-
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	-FMVZ-
Universidad de San Carlos de Guatemala	-USAC-
Instituto Nacional de Estadística	-INE-
Organización Internacional para la Salud Animal	-OIE-



1. Índice general

1.	Índice general	4
2.	Resumen y palabras claves	6
3.	Introducción	7
4.	Planteamiento del problema	8
5.	Delimitación en tiempo y espacio	8
6.	Marco teórico	9
7.	Estado del arte	10
8.	Objetivos	13
9.	Hipótesis	13
10	Materiales y métodos	14
10	Resultados y discusión	21
10.1	Resultados	21
10.2	Discusión de resultados	34
11	Referencias	41
12	Apéndices	50
13	Aspectos éticos y legales	96
14	Vinculación	96
15	Estrategia difusión, divulgación y protección intelectual	96
16	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS	96
17	Orden de pago final	97
18	Visado de la Dirección General de Investigación	98

Índice de tablas

1	Clasificación taxonómica y nombre común (para el área del oriente de Guatemala) de las aves capturadas durante los muestreos realizados en este estudio.....	21
2	Valores numéricos de parasitemia, nivel categórico de parasitemia (baja, media o alta) y género de hemosporidio identificado en los individuos que resultaron positivos a malaria aviar durante el análisis de frotos sanguíneos a través del microscopio en el presente estudio.....	23
3	Resultado del modelo lineal generalizado (binomial) de la probabilidad de infección en relación al tipo de hábitat donde se encuentran las aves del sitio de estudio.....	26
4	Resultado del modelo lineal generalizado (binomial) del nivel de parasitemia con relación a la estación del año.....	28
5	Riqueza, valores de diversidad (H=Shannon y S=Simposon) y nivel de prevalencia de malaria aviar según el sitio de muestreo del área de estudio.....	29

Índice de figuras

1	Mapa del sitio de estudio. Arriba: ubicación de la Región Semiárida del Valle del Motagua en Guatemala.....	14
2	Nivel de parasitemia según la especie de ave muestreada y el género de hemosporidio (<i>Haemoproteus</i> y <i>Plasmodium</i>) detectado en los frotos sanguíneos elaborados para este estudio	25
3	Gráfico de mosaico de Fisher para los datos de prevalencia de malaria aviar de aves muestreadas según el tipo de hábitat (rural o urbano) en el que se obtuvieron las muestras....	26
4	Gráfico de mosaico de Fisher para los datos de prevalencia de malaria aviar por género en las aves muestreadas en dos distintos tipos de hábitat (rural o urbano) para el estudio.....	27
5	Gráfico de mosaico de Fisher para los datos de prevalencia de malaria aviar en aves de corral (todas las aves cautivas y de corral) y gallinas de traspatio (solo de la especie <i>Gallus gallus</i>) por tipo de hábitat (rural o urbano)	28
6	Valor medio y barras de error para los valores de parasitemia de las aves evaluadas por tipo de hábitat (a) y por estación del año (b).....	28
7	Graficas de correlación de la riqueza (a) y la diversidad de aves (índice de Shannon=H) (b) por sitio y la prevalencia de malaria aviar para cada sitio en el área de estudio.....	30
8	Gráfica de correlación entre la riqueza (a) y la diversidad de aves (índice de Shannon =H) (b) por sitio de muestreo y el grado de parasitemia de malaria aviar en el área de estudio....	30
9	Gráfica de correlación entre el número total de registros de las aves por sitio de muestreo y el grado de parasitemia general de malaria aviar por sitio.....	31
10	Número de individuos capturados, diagnóstico para presencia de malaria aviar y valor de prevalencia para las familias de aves capturadas en el presente estudio.....	32

2. Resumen y palabras claves

El análisis de la prevalencia y parasitemia es fundamental para comprender la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Factores como el tipo de hábitat deben tenerse en cuenta ya que las condiciones ecológicas y la transformación del hábitat pueden influir en la propagación de este tipo de enfermedades. En este estudio analizamos la prevalencia y el nivel de parasitemia por malaria aviar en aves silvestres y de traspatio en un área de bosque seco, a través del análisis de frotis de sangre y PCR. Encontramos una alta prevalencia de malaria aviar (38%), de los cuales 63% de los casos fueron positivos para *Plasmodium* y 34% para *Haemoproteus*. No se encontraron casos de *Leucocytozoon*. La mayoría de las aves infectadas (66%) presentaron un nivel moderado de parasitemia. Además, no se observaron diferencias en la prevalencia entre los sitios rurales y urbanos. Sin embargo, los datos indican una mayor probabilidad de infección en entornos rurales. Esto podría estar asociado a la presencia de un mayor número de cuerpos de agua en ambientes más rurales que favorecen la reproducción y mantenimiento de poblaciones de vectores transmisores de esta enfermedad. Este trabajo sienta las bases para realizar estudios de malaria aviar en diferentes grupos de aves silvestres y en aves de corral del país. También abre la posibilidad de realizar estudios similares con otras enfermedades transmitidas por vectores con potencial para infectar animales domésticos y humanos mediante la técnica de PCR en la región Oriente de Guatemala.

Palabras clave: Enfermedades vectoriales, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, urbanización, paludismo, bosque seco tropical

Abstract and keyword

Prevalence and parasitaemia analysis is essential to understand the epidemiology of infectious diseases. Factors such as habitat type must be taking into account since ecological conditions and habitat transformation can influence the spread of these type of diseases. In this survey we analyze the prevalence and level of avian malaria parasitaemia in wild and backyard birds in a dry forest area, through blood smears analyzing and PCR. We found a high avian malaria prevalence (38%), of which 63% were positive for *Plasmodium* and 34% for *Haemoproteus*. No cases of *Leucocytozoon* were found. The majority of infected birds (66%) presented a moderate level of parasitaemia. Furthermore, no differences in prevalence were observed between rural and urban sites. However, the data indicate a higher probability of infection in rural settings. This could be associated with the presence of a greater number of water bodies in more rural environments that favor the reproduction and maintenance of vector populations that transmit this disease. This work lays the groundwork for the avian malaria surveys in different groups of wild and in poultry in the country. It also opens the possibility of carrying out similar studies with other vector-borne diseases with the potential to infect domestic animals and humans using the PCR technique at the Eastern region of Guatemala.

Keyword: Vector born diseases, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, urbanization, Guatemala, tropical dry forest

3. Introducción

Los parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) pertenecen al grupo de protozoarios del phylum Apicomplexa. Son parásitos cosmopolitas registrados en diversos grupos de aves y en todo el mundo, excepto en la Antártida. Estos parásitos han contribuido al declive (e incluso extinción local) de comunidades de aves insulares (Atkinson et al. 1995). Además, en el caso de las aves de crianza, en algunas partes del mundo, se han registrado pérdidas de hasta del cien por ciento de los individuos en granjas avícolas a causa de estos parásitos. Por lo tanto, un incremento de estos parásitos sanguíneos puede significar no sólo pérdidas de biodiversidad, sino también un impacto negativo a gran escala en la actividad avícola.

En Centroamérica, son pocos los estudios de malaria en aves, la mayoría son bastante antiguos y únicamente exploran la presencia de estos parásitos en algunos grupos de aves (Sousa y Herman 1982; Valkiunas et al. 2004; Young, Garvin y Macdonald. 1993). Para Guatemala, los estudios son aún más escasos y no existe ninguno que evalúe la prevalencia de esta enfermedad en poblaciones silvestres. En relación a esto, Fecchio et al. (2020) señala la necesidad de realizar mayor cantidad de estudios esta enfermedad en regiones poco muestreadas (especialmente en los trópicos), ampliando los estudios a diversos grupos de aves hospedadoras y tomando en cuenta varios géneros de parásitos hemosporidios con el fin de conocer mejor la prevalencia, rango de hospederos y diversidad real de parásitos sanguíneos de este grupo (Fecchio et al. 2020; Rivero y Gandon 2018a).

En particular, el estudio de esta enfermedad en animales silvestres puede generar información esencial para combatir enfermedades infecciosas emergentes debido a que los animales silvestres son un componente esencial en la epidemiología de la mayoría de estas enfermedades. El estudio de esta enfermedad en este grupo de aves puede contribuir a investigar los determinantes ecológicos de su dinámica de transmisión en condiciones naturales (Clark, Clegg, and Lima 2014). Su estudio también es de especial interés en salud pública por el parentesco filogenético de estos parásitos con los que infectan humanos (Gutiérrez-López & Martínez-de la Puente, 2020), así como por sus impactos económicos vía la infección de aves de traspatio y de crianza tecnificada, quienes frecuentemente no están adaptadas a la infección y mueren (Cornet y Sorci 2014).

Además, el estudio de esta enfermedad en ambientes perturbados también es esencial pues las condiciones ecológicas (por ejemplo, la riqueza de hospederos y las condiciones ambientales como el nivel de transformación del hábitat), pueden influir en la prevalencia y propagación de enfermedades transmitidas por vectores (Abella-Medrano et al. 2018).

En este trabajo analizamos la prevalencia y nivel de parasitemia de malaria aviar en aves silvestres y de traspatio en ambientes urbanos y rurales en un área de bosque seco tropical de Zacapa, Guatemala. La captura de los individuos silvestres se realizó empleando redes de niebla y las aves domésticas se muestrearon en sus sitios de crianza. La identificación de los parásitos se realizó a través del análisis al microscopio de frotis sanguíneos y usando la técnica de PCR multiplex.

Con este trabajo se generaron los primeros datos a nivel nacional de prevalencia y grado de parasitemia de malaria aviar en distintas especies de aves de traspatio y silvestres de la región del oriente del país. Además, se analizó cómo la prevalencia de esta enfermedad puede variar entre áreas urbanas y rurales y entre temporadas (seca y lluviosa). Con esta investigación se crearon las bases para el estudio de esta enfermedad en distintos grupos de aves silvestres y se estandarizaron los

métodos para detectar e identificar estos parásitos empleando muestras sanguíneas. Con este trabajo también se abre la posibilidad de realizar estudios similares con otras enfermedades transmitidas por vectores con potencial para infectar animales domésticos y humanos empleando la técnica de PCR en la región del oriente del país.

4. Planteamiento del problema

La malaria aviar es una enfermedad causada por distintas especies de protozoarios sanguíneos del género *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozon* (Valkiūnas 2005). Esta enfermedad ataca a numerosas especies de aves en todo el mundo 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 (*Culex quinquefasciatus*), causaron 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 aves de crianza en granjas avícolas a causa de la leucocitozoonosis (Santiago-Alarcón et al. 2012). Por lo tanto, un incremento de malaria aviar puede significar no sólo pérdidas de biodiversidad sino un impacto negativo a mediana y gran escala en la industria avícola (Santiago-Alarcón et al. 2012).

En Centroamérica, los estudios sobre malaria en aves son escasos. Los estudios realizados en la región son antiguos y se enfocan únicamente en explorar la presencia de estos parásitos en algunos grupos de aves (Sousa and Herman 1982; Valkiūnas et al. 2004; Young et al. 1993). Sin embargo, a partir de estos estudios se sabe que las infecciones más comunes son por parásitos de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* (Sousa and Herman 1982; Valkiūnas et al. 2004; Wahl 2013; Young et al. 1993) y en menor medida por *Leucocytozon* (Valkiūnas et al. 2004). Además, estos estudios sugieren que algunos grupos de aves son más susceptibles que otros y que la prevalencia de la enfermedad puede variar entre distintas épocas del año.

Para Guatemala, los estudios de esta enfermedad en aves son escasos y no existen trabajos que evalúen la prevalencia ni el nivel de carga parasitaria en poblaciones silvestres. Un estudio realizado en 2019 determinó la presencia de *Plasmodium* y *Haemoproteus* en granjas avícolas y de traspatio en Sanarate, El Progreso (Arocha-López 2019). Otros dos estudios más, uno en aves de traspatio (*Gallus gallus*) (Quevedo-Salazar 2012) y otro en aves de una colección zoológica (Orozoco-Jauregui 2014) no encontraron presencia de los parásitos. Sin embargo, estos dos últimos muestran deficiencias en los procesos de detección de la infección y no exploran factores ecológicos o ambientales asociados a la presencia de los parásitos. Por ello, existe la necesidad de realizar estudios adecuadamente estructurados, que consideren detalladamente la ecología de esta enfermedad en el país, ampliando los estudios a diversos grupos de aves hospederas y tomando en cuenta varios géneros de parásitos hemospodios.

5. Delimitación en tiempo y espacio

Delimitación en tiempo

El estudio se realizó de febrero a diciembre del 2021; la fase de campo se llevó a cabo de marzo a septiembre de 2021 y la fase de laboratorio de agosto a diciembre de 2021.

Delimitación espacial

El estudio se llevó a cabo en áreas urbanas y rurales del departamento de Zacapa, dentro de la Región Semiárida del Valle del Motagua -RSVM-. Esta región está ubicada en el este de Guatemala, entre 300 a 900 msnm (Fig. 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 antrópicos que incluyen cultivos (principalmente de melón, sandía, limón, tabaco, mango y okra), pastos, áreas de pastoreo y asentamientos humanos.

6. Marco teórico

Técnica de PCR. La técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa o Polymerase Chain Reaction) permite obtener millones de copias de un fragmento ADN a partir de una sola molécula que pueda encontrarse en una muestra de extracción de ADN. Esta técnica basa su efectividad en simular los procesos de replicación de una hebra molde de ADN en dos nuevas hebras. Aprovecha las tareas que a nivel de la célula realizan una serie de proteínas entre otras funciones pueden: identificar sitios de origen de la replicación del material genético, apertura y desenrollamiento de la hélice de ADN, estabilización de la doble hebra durante el proceso, complementariedad de bases durante la replicación, reemplazo de cebadores por secuencias de ADN cortas, entre otras). En este proceso es imprescindible la ADN polimerasa quién incorpora los nucleótidos complementarios a la hebra madre durante la síntesis de la cadena de ADN nueva. Durante el proceso de PCR, la síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo en un tubo de reacción, en el cual se agrega el ADN que contiene los fragmentos que se van a amplificar; la ADN polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio (MgCl₂) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis. Esta mezcla se somete a la acción de varios ciclos repetidos de distintas temperaturas (ciclo de PCR) que sustituyen a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación que ocurre dentro de las células (Díaz y Rentería 2014).

El proceso de PCR inicia con la separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C. Esta condición de temperatura rompe los puentes de hidrógeno que mantienen unidos a las bases nitrogenadas complementarias en una doble hélice de ADN. Después de su separación, la temperatura debe descender entre 40 y 60 °C. Esto último, permite que los iniciadores se alineen a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar. Después, la temperatura debe incrementar a 72 °C (aunque esto puede variar ligeramente) lo que permite que la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Con la acción de la DN polimeraza la nueva cadena empieza a sintetizarse en sentido 5' a 3'. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento de interés (Díaz y Rentería 2014).

Frotos e identificación de parásitos hematosporidios. La sangre que se obtiene de un ave y que está en tubos microcapilares con heparina (anticoagulante) se utiliza para hacer frotis sanguíneos. Para

ello se coloca una gota de sangre sobre un portaobjetos, utilizando la orilla de otro portaobjeto (se debe mantener un ángulo de 45° con respecto al portaobjeto horizontal que tiene la gota de sangre) se expande la gota sobre dicha orilla y se extiende sobre el portaobjeto para hacer el frotis. Cuando el ambiente es seco las laminillas se pueden dejar secar solas. Una vez que los frotis sanguíneos estén secos, estos se colocan en metanol al 100% para fijar la muestra durante 3 a 4 minutos. Luego se sacan y se dejan secar a temperatura ambiente. Para trabajar con hemosporidios los frotis se tiñen con Giemsa histológico. La identificación de la identidad de los parásitos se realiza usando claves taxonómicas especializadas y publicaciones donde se describen las especies de parásitos identificadas recientemente (Santiago-Alarcon 2015).

Método de transectos de muestreo para estimar riqueza y densidad de aves. Este método es utilizado a nivel mundial para monitorear tendencias poblacionales de vertebrados. Es fácil de realizar y proporciona información sobre las relaciones de las aves con su hábitat, diversidad y abundancia de especies, y los efectos de la gestión y el cambio ambiental en las poblaciones de aves en un período de tiempo específico. Además, tiene la ventaja de poder realizarse en un tiempo corto, generalmente de un día (Greene y Efford 2012). Durante el muestreo, se recorre un trayecto de aproximadamente 2 km de largo. Sobre este trayecto se marcan puntos de conteo separados uno del otro por 100 o 150 metros lineales. Cada punto de conteo tiene asignado un dato de georreferenciación. Sobre cada punto se registran durante 10 minutos todas las aves detectadas. Para cada individuo se registra la especie y la distancia perpendicular exacta a la que se encontró de la marca del punto de conteo. La observación detallada de cada individuo se realiza utilizando binoculares y la distancia se estima utilizando un Range Finder.

7. Estado del arte

Estudio de parásitos sanguíneos causantes de malaria aviar en el Neotrópico

La mayor parte de los estudios sobre parásitos sanguíneos que infectan aves han sido realizados en zonas templadas de Norte América y Europa (Valkiūnas 2005). Durante el siglo pasado, los estudios en la región neotropical se realizaron de manera ocasional. Sin embargo, en la actualidad el número de estudios sobre malaria en aves ha incrementado, particularmente en países como Brasil (Braga et al. 2011), Venezuela (Belo et al. 2012), y Colombia (González et al. 2014). En estos estudios se han empleado técnicas moleculares de PCR y microscopía para la detección de estos parásitos (Santiago-alarcon 2015). No obstante, para el resto de países neotropicales aún existe un importante vacío de información principalmente sobre estudios en aves silvestres (Braga et al. 2011; Sibley et al. 2001; Santiago-Alarcón y Marzal 2020).

Estudios de malaria aviar en México y Centro América

En México, los estudios más recientes reportan la presencia de parásitos del género *Haemoproteus* en palomas (familia Columbidae), Cenzontles nortños (*Mimus polyglottos*) (Carlson et al. 2013) y Tortolitas de Socorro (*Columbina passerina socorrensis*) (Carlson et al. 2011). También se han registrado infecciones por *Leucocytozoon* y *Trichomonas* en otras especies de aves silvestres (Carlson et al. 2011; Young et al. 1993). Para la región Centroamericana se han realizado algunos estudios, principalmente en Panamá, Belice y Costa Rica. No obstante, la mayoría son antiguos y

únicamente exploran la presencia de distintas especies de parásitos de malaria en distintos grupos de aves.

Para esta región las infecciones más comunes son por *Haemoproteus* (con prevalencias hasta el 80% en especies como *Chlorospingus flavopectus*) (Hernández-Lara, Carbó-Ramírez y Santiago-Alarcon 2020) o con un 4,8–9% de los casos (Sousa and Herman 1982; Valkiunas et al. 2004; Young et al. 1993). Entre los estudios más interesantes se encuentra el de Young et al. (1993) realizado en Costa Rica, en el que el 51% de aves muestreadas (479 individuos de distintas especies) estaban infectadas por al menos una especie de hematozoo. En este estudio, el parásito más común fue *Haemoproteus* sp. El resto de los géneros fueron raros. La infección fue más común en tucanes (Familia Ramphastidae) y mosquitos (Familia Tyrannidae), y poco frecuente en otros taxones. En las especies residentes, las infecciones fueron más comunes durante la época lluviosa, cuando mayor número de especies se reproducen. La intensidad de la infección en los individuos adultos infectados fue baja ($=12.5, \pm 3.7$ células infectadas por 10,000).

Otro estudio realizado en Costa Rica, que examinó 354 aves de 141 especies del Área de Conservación de Guanacaste, 44 (12.4%) de los individuos estaban infectadas con parásitos sanguíneos; 8% por microfilarias, 5% por *Hemoproteus* y el resto por *Plasmodium* y *leucocitozoon* (Valkiunas et al. 2004). Finalmente, en un estudio más reciente, se determinó la presencia de parásitos de malaria en Zopes Negros (*Coragyps atratus*) de Costa Rica, con una prevalencia de *Plasmodium* de 46.2% y de 58.8% para microfilarias (Wahl, 2013).

En el caso de Guatemala, un estudio evaluó la presencia de malaria en Gallinas (*Gallus gallus*) criadas de forma tecnificada en el Municipio La Gomera, en Escuintla mediante la técnica de PCR. De las 82 muestras analizadas ninguna presentó los parásitos. Al parecer, en este caso la falta de detección de los parásitos estuvo relacionada con posibles deficiencias en el protocolo de amplificación del ADN del parásito y en la falta de efectividad de los marcadores moleculares que se emplearon. En este caso, el autor recomendó especial atención a la dilución de las muestras y pureza del ADN para trabajar con una muestra de buena calidad y emplear un PCR anidado en lugar de uno convencional (Quevedo-Salazar 2012).

Otro estudio, realizado por Ochoa-López (2018) en aves criadas de forma tecnificada y en aves de traspato, encontró una alta prevalencia de parásitos, principalmente del género *Plasmodium*. En este estudio, el 88% las aves tecnificadas y el 76% de las de traspato presentaron la infección. Únicamente un individuo de traspato presentó infección por *Haemoproteus*.

Por otro lado, en Guatemala no existen estudios que evalúen la prevalencia de malaria en poblaciones silvestres. Sin embargo, Orozco-Jauregui (2014) exploró esta idea a partir de determinar la presencia de *Plasmodium* sp. en frotis sanguíneos de aves del Zoológico Nacional La Aurora. En este caso, de los 287 individuos analizados, ninguno presentó la infección. Según el autor, la ausencia de registros de estos parásitos se debió probablemente a que las condiciones climáticas y de altitud de la ciudad capital no son idóneas para que se complete tanto el ciclo de vida del vector como del parásito. También indicó que debido a que la fase de infección en que se encuentre el ave influye en la cantidad de parásitos en sangre, si las aves muestreadas se encontraban en un estadio avanzado de infección las pruebas al parecer no detectaron la infección. Por ello, señaló la necesidad de realizar pruebas complementarias como PCR para este tipo de diagnósticos.

Infección por malaria en aves de traspatio y avícolas

En la industria avícola, la malaria aviar y la leucocitozoonosis es una causa común de carne de baja calidad, baja producción de huevos y alta mortalidad. Los signos asociados con dichas enfermedades en aves de traspatio incluyen una cresta pálida, heces verdes, anorexia, temperatura corporal elevada y anemia. Estos síntomas no se deben necesariamente a la infección de malaria y los signos clínicos pueden variar y en fases graves pueden causar la muerte con una tasa de mortalidad superior al 80%. Al parecer los pollos nativos son más resistentes a la infección que los pollos comerciales. Sin embargo, algunas gallinas adultas infectadas pueden desarrollar infecciones asintomáticas. En la gallina doméstica se ha descrito la infección con dos tipos de *Plasmodium*, *Plasmodium gallinaceum* restringido al viejo mundo, parásito de grandes dimensiones que posee esquizontes redondeados o irregulares que dislocan el núcleo del eritrocito, y *Plasmodium juxtanucleare* que se ha reportado en varios países de América latina, Asia y África (Souza et al. 2000).

Grado de susceptibilidad de aves silvestres a la infección por parásitos de malaria

La mayoría de los parásitos de malaria tienen un amplio rango de especies de aves hospedadoras (Beadell et al. 2006). Sin embargo, la susceptibilidad de las aves a los parásitos puede variar entre especies y entre individuos de la misma especie. Por ejemplo, un estudio con *Plasmodium relictum* mostró que hay marcadas diferencias en la susceptibilidad de cinco especies de passeriformes a este parásito (Palinauskas et al. 2009). El Estornino (*Sturnus vulgaris*) fue completamente resistente y unos pocos gorriónes comunes (*Passer domesticus*) fueron susceptibles. Sin embargo, todos los individuos de las especies *Loxia curvirostra*, *Spinus spinus* y *Fringilla coelebs* se infectaron fácilmente. Por el contrario, se ha reportado algunos linajes de *Plasmodium* que solo pueden infectar a algunas especies de aves en África. En su estudio, Young et al. (1993) reporta mayor infección en tucanes (Familia Ramphastidae) y mosqueros (Familia Tyrannidae), e indica que las infecciones fueron poco frecuentes en otros taxones. En las especies residentes, las infecciones fueron más comunes durante la época lluviosa, cuando mayor número de especies se reproducen. Las diferencias de prevalencia y nivel de parasitemia entre especies se han relacionado con características de historia de vida de los hospedadores como condiciones de exposición o resistencia al parásito (González et al. 2014).

Efecto de la urbanización en el grado de infección por parásitos de malaria en aves

El impacto de la urbanización en la prevalencia y parasitemia de parásitos de malaria en aves depende de diversos factores incluidos las características del hábitat, características del entorno urbano (por ejemplo: espacios verdes versus áreas con altas densidades de carreteras y edificios como se indica en varios estudios (Hernández-Lara, González-García, y Santiago-Alarcón 2017), rasgos de historia de vida de las aves, entre otros. Sin embargo, existen pocos estudios de infección por malaria en aves en entornos modificados por el hombre, particularmente en ciudades (Santiago-Alarcón et al. 2019), que permitan discernir patrones generales. Por ejemplo, la prevalencia de parásitos del género *Plasmodium* de África occidental fue mayor en los bosques perturbados en comparación con los no alterados, mientras que lo contrario fue cierto para los parásitos del género *Haemoproteus* (Bonneaud et al. 2009).

Otros estudios sugieren que hay una menor prevalencia, pero mayor grado de parasitemia en ciudades en comparación con áreas no urbanas. Además, los ensamblajes de parásitos en espacios

verdes urbanos pueden ser tan diversos como los que se encuentran en áreas no urbanas. Además, las actividades antrópicas (por ejemplo, prácticas forestales, agricultura y ganadería y modificación de la estructura del hábitat) parecen afectar de manera diferente la probabilidad de infecciones por hemosporidios para diferentes especies de aves, incluso cuando las especies de aves tienen rasgos similares de historia de vida y están expuestos a los mismos factores ambientales (por ejemplo, estructura de la vegetación) (ej: Ayadi et al. 2018; Hernández-Lara et al. 2017).

8. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la prevalencia y parasitemia de malaria en aves de traspatio y silvestres en áreas con distintos usos del suelo en una región del oriente de Guatemala.

Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia e intensidad de infección por malaria aviar en aves de traspatio y silvestres del sitio de estudio.
- Comparar la prevalencia y parasitemia de malaria aviar en aves de traspatio y silvestres de áreas urbanas y rurales del sitio de estudio.
- Establecer si existe diferencia en la prevalencia y nivel de parasitemia de parásitos de malaria aviar entre distintas especies de aves de traspatio y silvestres capturadas en el sitio de estudio.
- Determinar si existe una asociación entre la riqueza de aves silvestres potenciales hospedadoras de malaria aviar y la prevalencia y parasitemia de esta enfermedad en aves silvestres y de traspatio en el sitio de estudio.

9. Hipótesis

La prevalencia de parásitos de malaria aviar en aves de traspatio y silvestres será mayor en áreas rurales del sitio de estudio.

La parasitemia de malaria aviar en aves de traspatio y silvestres será mayor en áreas urbanas del sitio de estudio.

La prevalencia de parásitos de malaria será distinta entre distintas familias de especies silvestres capturadas en el área de estudio.

La abundancia (pero no la riqueza) de especies de aves potenciales hospedadores de malaria aviar será mayor en áreas urbanas y esto estará asociado a un nivel más alto de parasitemia.

10 Materiales y métodos

10.1 Enfoque de la investigación

10.2 Método

Sitios de muestreo y colecta de aves silvestres

Las aves silvestres se colectaron empleando redes de niebla. Las redes se ubicaron en 15 localidades distintas del departamento de Zacapa. La ubicación y coordenadas de su ubicación se pueden consultar en la Figura 1 y el apéndice 1 de este informe. Para la toma de muestras se realizó un premuestreo de cuatro días el mes de abril de 2021 y tres muestreos largos (de cinco a seis días cada uno) los meses de junio, julio y octubre de 2021.

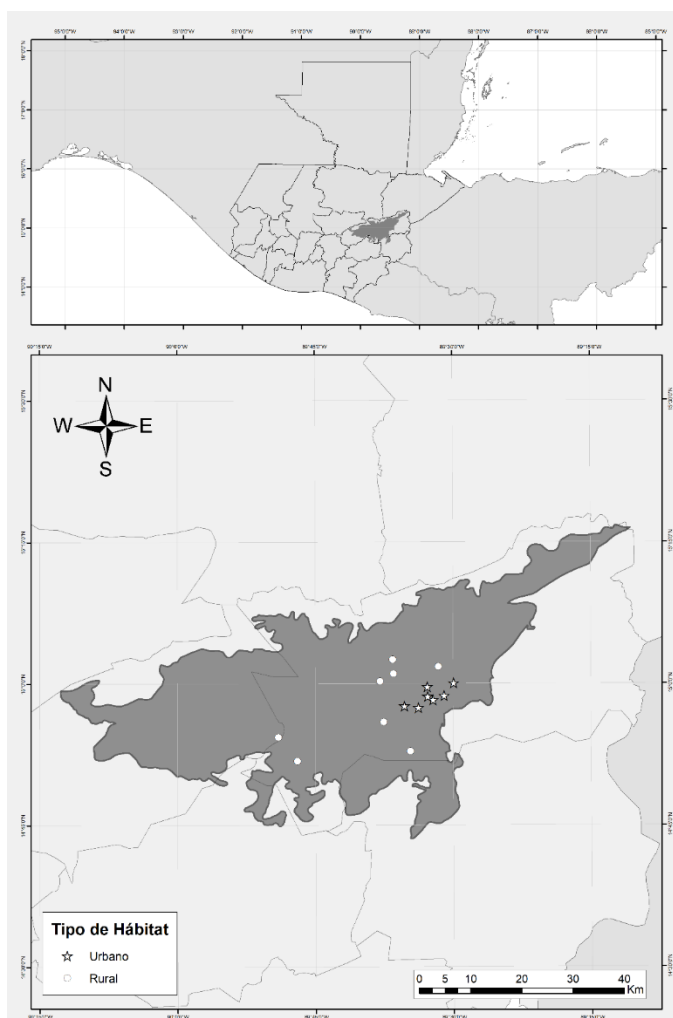


Figura 1. Mapa del sitio de estudio. Arriba: ubicación de la Región Semiárida del Valle del Motagua en Guatemala. Abajo: ubicación de sitios de muestreo según el tipo de hábitat visitado dentro de la Región Semiárida del Valle del Motagua -RSVM- en Guatemala.

Los sitios de muestreo se clasificaron como urbanos o rurales en base al criterio empleado por el INE. Según este criterio, un área rural es un lugar poblado que se reconocen oficialmente con la categoría de aldeas, caseríos, parajes, fincas, etc., de cada municipio. Incluye a la población dispersa. Por su parte, un área urbana es una ciudad, villa y pueblo (cabeceras departamentales y municipales), así como a aquellos otros lugares poblados que tienen la categoría de colonia o condominio y los mayores de 2,000 habitantes, siempre que, en dichos lugares, el 51 por ciento o más de los hogares disponga de alumbrado con energía eléctrica y de agua por tubería (chorro) dentro de sus locales de habitación (viviendas) (INE, 2019).

En cada sitio de estudios se ubicaron cinco redes de niebla (tres redes de 12 m y dos redes de cinco m de largo). Las redes se abrieron por uno a dos días en cada sitio, de 6:30 a 11:30 am. Cada sitio se visitó dos veces (uno durante la época seca y otro durante la época lluviosa).

Las aves capturadas se sexaron, pesaron y se les tomaron algunas medidas corporales (incluyendo el largo de ala, largo de cola, largo y ancho de pico). Cuando fue posible se estableció su edad (mediante la inspección del plumaje y/o nivel de osificación craneal). Además, se estableció la cantidad de grasa corporal acumulada usando el siguiente rango: 0: grasa corporal ausente, 1: leve cantidad de grasa, 2: cantidad media de grasa con depósitos visibles en los flancos, 3: grasa abundante y 4: grasa excesiva en flancos y vientre.

Toma de muestras sanguíneas

A cada individuo capturado se le extrajo una muestra de sangre. Inicialmente, según su tamaño, las aves se clasificaron en: aves muy pequeñas: de 1 a 20 g; aves pequeñas: de 21 a 80 g; aves medianas: de 81 a 200 g y aves grandes: de 201 a 500 g. A partir de su tamaño, se estableció el tipo de jeringa que se emplearía para la extracción de sangre: en aves muy pequeñas se empleó jeringas de 3ml con aguja calibre 23 X 1", en aves pequeñas y medianas se utilizaron jeringas de 1ml con aguja calibre 27 X 13mm y en aves grandes se usaron jeringa de 3ml calibre 23X1".

Para obtener las muestras, inicialmente, y con la ayuda de un compañero de trabajo, se sujetó al ave y después se extendió el ala derecha del animal sobre la mesa de trabajo. Después, a lo largo del ala se ubicó la vena braquial. El área sobre y alrededor de la vena se limpió con alcohol en spray al 70%. Empleando un hisopo de mediano tamaño, se hizo hemostasis sobre la vena. La hemostasis se realizó aplicando presión en la base de la vena, en el área proximal al cuerpo del ave. Para extraer la sangre, se punzó la vena braquial con la aguja y posteriormente se retrajo el émbolo hasta coleccionar un mínimo de 0.3 ml de sangre para aves pequeñas (de aproximadamente 50 g) y 0.5 ml en aves de mayor peso (más de 50 g).

Para las aves muy pequeñas se extrajo la cantidad que pudo obtenerse a través de la punción cardíaca. Al completar la cantidad de fluido deseado, se detenía la hemostasis y se realizaba presión en el área de penetración de la aguja con un algodón seco. Finalmente se retiraba la aguja. Cuando fue necesario, se empleó un polvo para detener sangrados y facilitar la coagulación de la marca MiracleCare. La sangre colectada en las jeringas se vació en tubos tapón morado con EDTA (para evitar la coagulación de la sangre colectada), dejando que resbalara por las paredes del tubo. En muestras de 0.3 ml o menos, se agregó al tubo tapón una gota adicional de EDTA y mediante movimientos declinantes se homogenizó la muestra.

Para la punción cardíaca en aves de pequeño tamaño (como colibríes) inicialmente se sujetó al ave con la mano izquierda. Después se flexionó lateralmente su cabeza. Se introdujo la aguja pasando por debajo de la clavícula, en dirección al plano medio del ave, siguiendo por debajo del esternón en línea con la quilla, y continuando hacia la región posterior del ave. La aguja se posicionó dentro del corazón en la final del primer tercio del ave. Cuando la aguja se encontraba en posición se retrajo el émbolo hasta extraer toda la sangre posible.

Durante las colectas, dos circunstancias hicieron necesario el sacrificio de algunos individuos. Algunos de ellos se colectaron para ingresar su piel a la colección de pieles de aves del instituto de investigaciones del CUNZAC (ver copia de permiso de colecta en el apéndice 2) y otras debido a su bajo peso y pequeño tamaño. En el caso de estas últimas, la toma de muestras sanguíneas solo era posible mediante la extracción cardíaca de sangre, por lo que fue necesario realizar eutanasia posterior a la toma de muestra.

El proceso de eutanasia lo realizó la médico veterinaria del equipo de investigación y se realizó en base al protocolo de eutanasia aprobado por el comité de bioética de Posgrado de la FMZ de la USAC. Después de colectar la muestra sanguínea se sujetó al ave con la mano izquierda en posición ventrodorsal, se extendió y rotó el cuello hacia su lateral izquierdo y se ingresó la aguja por debajo de la clavícula siguiendo la quilla hasta llegar al corazón. Después de posicionada la aguja, se realizó una pequeña retracción del émbolo de la jeringa hasta observar contenido sanguíneo para asegurar que esta estuviera dentro de la cavidad cardíaca. Después se inyectaron 0.3 ml de pentobarbital sódico dentro de ella. La dosis del químico se estandarizó para todos los tamaños de aves menores a 500 g.

Las aves colectadas se colocaron en bolsas ziploc rotuladas con fecha, lugar y nombre del sitio y se almacenaron en una hielera específica para este fin. Posteriormente, las aves colectadas se colocaron en un congelador. Las aves colectadas se prepararán y se ingresarán a la colección de aves del museo de ciencias del CUNZAC. El protocolo de colecta de sangre fue aprobado por el comité de bioética de Posgrado (CBP) de la FMVZ de la USAC.

Elaboración de frotos sanguíneos

Después de la toma de las muestras sanguíneas de cada individuo, se procedió a tomar una pequeña cantidad de la sangre de la jeringa para realizar un frote sanguíneo para cada individuo. Previo a la toma de la muestra, sobre la mesa de trabajo se colocaron dos láminas portaobjetos esmeriladas. Una de las láminas se ubicó en posición horizontal sobre la mesa, con el área esmerilada apuntando hacia la mano izquierda del investigador. El otro portaobjetos se empleó para correr la sangre. Se colocó una gota pequeña de sangre en la base de la lámina (pegada a la zona esmerilada) e inmediatamente después de colocar esta gota se extendió (con una retracción previa leve) hacia el extremo contrario de la lámina empleando para todo esto poca fuerza y precisión. El área esmerilada de la lámina se rotuló escribiendo a lápiz el número de colecta del ave y su nombre científico. Tras dejar secar por cinco minutos, con el uso de una pipeta plástica se agregó metanol absoluto sobre la muestra. Después, se retiró el exceso de metanol y se dejaron secar al aire libre. Cuando las muestras se habían secado, se almacenaron en cajas para guardar láminas y se llevaron al laboratorio.

Toma de datos de diversidad de aves en sitios de estudio

En cada sitio de colecta se recorrió un trayecto de aproximadamente 1.5 km de largo. El trayecto se recorrió empleando senderos o caminos ya existentes que recorrían cada lugar. Sobre cada trayecto se marcaron ocho puntos de conteo separados uno del otro por 100 metros lineales. Cada punto de conteo se georreferenció. En cada punto se registraron durante ocho minutos todas las aves detectadas. La detección se realizó a través de la observación directa de cada individuo o a través de la identificación de su canto.

En cada punto se anotó la siguiente información: fecha, hora, número de punto de conteo y condiciones climáticas (nubosidad, día despejado, ambiente templado o frío, entre otros). Para cada individuo observado se registró la especie a la que pertenecía, sexo (cuando la morfología de la especie lo permite), la actividad que realizaba (ej: alimentándose, anidando, volando, cantando, entre otros) y la distancia perpendicular exacta a la que se encontraba de la marca del punto de conteo. La observación directa se realizó empleando binoculares marca Bushnell 10 x 42. La distancia se calculó utilizando un Range Finder marca Nikon, Aculon. En cada muestreo participaron dos observadores.

Para identificar las especies en campo se emplearon guías de aves de la región incluyendo la Guía de aves de México y Norte de Centro América (Howell y Webb, 1995) y la guía de aves de Norte América de National Geographic Society (Dunn y Aldefer, 2017). Además, se empleó la guía digital Merlin. En el caso de los cantos que no fueron reconocidos en campo, se grabaron y después se compararon con cantos de la base Xenocanto (www.xenocanto.com). Los muestreos se realizaron el primer día de los muestreos para toma de muestras sanguíneas, generalmente de 7:30 a 10:30 am.

Tinción de frotis sanguíneos

Los frotis sanguíneos se tiñeron en el laboratorio empleando la tinción Giemsa. Inicialmente se preparó la solución de tinción mezclando y homogenizando tres ml de solución Giemsa madre (marca Merk) y nueve ml de agua destilada. Después, sobre cada frote se agregó la tinción hasta cubrir todo el frote. Esta se dejó actuar por 20 minutos. Posteriormente, las láminas se lavaron con abundante agua que se dejó correr suavemente sobre las láminas empleando una jeringa. Finalmente, las láminas se dejaron secar al aire libre por 30 min y se almacenaron en cajas para guardar láminas.

Análisis de frotis sanguíneos al microscopio y cálculo de parasitemia

El análisis al microscopio de las láminas tuvo como objetivo determinar la presencia de parásitos en las muestras y en caso de ser positivas, calcular un índice de parasitemia para cada individuo.

Inicialmente, las muestras se evaluaron con el objetivo 40X. Si estas daban positivo para parásitos de malaria aviar tras 30 minutos o menos de observación, se contabilizaban en objetivo de inmersión (100X) 10 campos seleccionados al azar en cada lámina. Estos campos en total contenían entre 1000 a 5,000 glóbulos rojos. En cada campo se contabilizó la cantidad de glóbulos rojos parasitados y el total de glóbulos rojos por campo.

Los datos de número de parásitos por campo por muestra se ingresaron en boletas de laboratorio en las que se colocó el número de muestra (número de registro del individuo capturado), la especie a la que pertenecía el ave, el número de campos observados, el número de glóbulos rojos contabilizados

por campo y el número de parásitos por campos. Además, se tomaron fotografías de los parásitos en todas las láminas que resultaron positivas.

Protocolo de extracción de ADN en las muestras colectadas.

Para estandarizar el protocolo de extracción de ADN de las muestras sanguíneas inicialmente se realizaron pruebas de extracción con doce muestras colectadas en campo. Para las pruebas, y para las extracciones de ADN posteriores, se empleó el kit de extracción IB47202 Genomic DNA MiniKit (Blood/Cultured Cell) de la marca IBI Scientific. Durante la estandarización se probaron con muestras de 100, 75, 50 y 25 μL de sangre. Establecimos que la cantidad máxima de sangre que se debía emplear para este proceso era de 25 μL , debido a que volúmenes mayores obstruían las columnas de filtración obstaculizando el proceso. A continuación, se describe el protocolo de extracción utilizado en el presente estudio:

Parte I

Despachar 25 μL de sangre en un tubo de 1.5 ml.

Añadir 150 μL de Buffer Lisis RBC.

Mezclar por inversión (NO usar vortex).

Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 3,000 xg por 5 min.

Remover el sobrenadante por completo.

Agregar 100 μL de RBC Lysis Buffer para re- suspender.

Parte II

Agregar 200 μL de GB Buffer y mezclar vigorosamente

Incubar a 60 °C por 20 min. hasta que aclare.

Durante la incubación invierta el tubo cada 3 min.

Añadir 5 μL de ARNasa (10 mg/ml).

Incubar por 5 min a temperatura ambiente.

Parte III

Precalentar la elusión buffer a 60 °C (200 μL por muestra).

Añadir 200 μL de etanol absoluto al lisado mezclar vigorosamente por 10 seg.

Romper el precipitado en caso de formarse.

Transferir a una columna GD y centrifugar a 14-16000 gx por 5 min.

Descartar el filtrado y colocar la columna GD de nuevo.

Añadir 400 μL de W1 Buffer y centrifugar a 14-16000 gx por 40 seg.

Descartar el flujo y colocar de nuevo en la columna.

Añadir 600 µL de Wash Buffer a la columna GD.

Centrifugar a 14-16000 xg por 40 seg y descartar el flujo.

Centrifugar por 3 min de 14-16000 gx para secar.

Parte IV Elución

Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml.

Añadir 50 µL de buffer de elución precalentado (hasta llegar a 100 / 2 veces).

Dejar repodar por 3 min.

Centrifugar a 14-16000 gx por 30 seg.

Método de PCR

Para este estudio se realizó el PCR multiplex propuesto por Ciloglu et al (2019). La reacción de PCR se llevó a cabo en una concentración final de 1X JumpStart™ Taq ReadyMix™, 0.4 µM de cada primer y 50 ng de ADN. El programa del termociclador consistió en: a) desnaturalización hotstart a 94°C por 2 min, b) 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación a 54.5°C a 30 s y extensión a 72°C a 2 min, c) extensión final de 72°C por 5 min. Todas las tandas de PCR se realizaron acompañadas de un control negativo para verificar que las muestras no se hubieran contaminado.

Verificación de positivos/negativos

Se elaboraron geles de agarosa al 1.5% con gel GelRed™ (Biotium, Inc., Hayward, CA, EE. UU.). Las muestras se corrieron a 110 volts y 90 mAmp durante 40 minutos. Posteriormente se trasladaron al transiluminador en donde se verificó la presencia de bandas de amplificación.

10.3 Procesamiento y análisis de la información

Se calcularon valores generales de prevalencia (usando los datos por detección mediante frotos sanguíneos y PCR). Además, se calcularon valores de prevalencia por grupos de aves (silvestres y de traspato) y por tipo de hábitat.

Para calcular los valores de parasitemia (en las muestras positivas en frotos sanguíneos) se dividió el número de glóbulos rojos parasitados y total de glóbulos rojos en 10 campos de observación por lámina (Alarcón y Carbó-Ramírez, 2015), usando la siguiente formula: Parasitemia = total de glóbulos rojos infectados / total de glóbulos rojos contabilizados en 10 campos. Posteriormente, las muestras se asignaron a cuatro categorías (en base al número de parásitos contados en relación a la cantidad de glóbulos rojos contabilizados): Bajo: “+” = 1 a 10 parásitos /10,000 glóbulos rojos; Moderado: “++” = 11 a 100 parásitos/10,000 glóbulos rojos; Moderado alto “+++” = 1 a 10 parásitos/100 glóbulos rojos y Alto “++++” ≥ 11 parásitos/100 glóbulos rojos.

Para evaluar la asociación entre la prevalencia y el tipo de hábitat (rural y urbano) se empleó la prueba exacta de Fisher. Esta prueba es un método no paramétrico para comparar la proporción de categorías en dos grupos independientes diferentes (variables categóricas) en una tabla de contingencia. Las variables categóricas deben medirse de forma dicotómica (en este caso: prevalencia como positivo y negativo y hábitat como urbano y rural). A diferencia de una prueba de chi-cuadrado, la prueba exacta de Fisher es una prueba exacta (devuelve un valor de p exacto) y se puede aplicar en tamaños de muestra más pequeños (<1000). Esta prueba es una alternativa a la prueba de chi-cuadrado, especialmente cuando el conteo de frecuencia es < 5 para más del 20% de las celdas (como es el caso de este estudio). En la prueba exacta de Fisher, la probabilidad de obtener resultados (frecuencias observadas) se calcula directamente a partir de la distribución hipergeométrica y no mediante el uso de estadísticas de prueba.

Para analizar la probabilidad de que un ave se contagie de malaria y tenga una carga parasitaria menor o mayor en relación al tipo de hábitat y estación del año (seca o lluviosa) utilizamos modelos lineales generalizados (GLM) con distribución binomial para los datos de infección (positiva o negativa) y de parasitemia (proporción de glóbulos rojos infectados del total contabilizado). Se generaron modelos simples y con interacción de las variables y se evaluaron los modelos utilizando el valor de AIC de cada modelo (seleccionando el que tuviera un valor más pequeño) y observando los valores de RMSE de valores reales y valores predictivos del modelo. Las variables que no presentaron efecto significativo y los modelos con menor AIC fueron descartados.

Para establecer el nivel de correlación entre los valores de prevalencia y el nivel de parasitemia con la riqueza y diversidad de aves potenciales hospedadoras en el sitio de estudio se usó el valor de correlación de spearman y se graficaron los datos con intervalos de confianza del 95%.

Para determinar si existe diferencia entre los valores de parasitemia de las muestras obtenidas de ambientes urbanos y rurales se empleó la prueba de Kruskal-Wallis después de comprobar mediante pruebas de Shapiro-Wilk (normalidad) y F-test (homocedasticidad) que los datos no tienen normalidad.

Se generaron valores de diversidad de aves por hábitat y por sitio de muestreo (Índice de Shannon-Wiener =H e índice de Simpson =S) de aves por sitio.

Para el análisis de la asociación entre el nivel de riqueza y diversidad de aves por sitio de estudio y el grado de parasitemia de las aves muestreadas se empleó una prueba de Kruskal-Wallis.

Todos los análisis se realizaron en el software R v.3.0.2 (RDevelopment Core Team, 2012).

10 Resultados y discusión

10.1 Resultados

Diversidad de aves capturadas durante el estudio

Durante los muestreos con redes de niebla se capturaron 194 individuos pertenecientes a 33 especies de aves. Estas especies están distribuidas en ocho órdenes y 17 familias (Tabla 1). Esta riqueza de aves corresponde al 4.3% de aves registradas para Guatemala (Eisermann y Avendaño 2018) y al 15% de las aves registradas para los bosques secos del país (Universidad Rafael Landívar (Guatemala). Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente IARNA/URL 2008). Únicamente el ave gato gris (*Dumetella carolinensis* (Linnaeus, 1766) y el picogruoso pechirroja (*Pheucticus ludovicianus* (Linnaeus, 1766)) son especies migratorias en la región, las demás son residentes del lugar.

Tabla 1

Clasificación taxonómica y nombre común (para el área del oriente de Guatemala) de las aves capturadas durante los muestreos realizados en este estudio

Orden, familia y especie	Nombre común
ANSERIFORMES	
Anatidae	
<i>Anas platyrhynchos</i> (Linnaeus, 1758)	Azulón
<i>Dendrocygna autumnalis</i> (Linnaeus, 1758)	Pijije
CAPRIMULGIFORMES	
Trochilidae	
<i>Amazilia rutila</i> (Delattre, 1843)	Colibrí canelo
COLUMBIFORMES	
Columbidae	
<i>Columba livia</i> (Gmelin, JF, 1789)	Paloma de campanario
<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	Tortolita inca
<i>Columbina passerina</i> (Linnaeus, 1758)	Tortolito pico rojo
<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1810)	Tortolita colorada
<i>Zenaida asiatica</i> (Linnaeus, 1758)	Torcaza
Cuculidae	
<i>Crotophaga sulcirostris</i> (Swainson, 1827)	Pijuy
Phasianidae	
<i>Gallus gallus</i> (Linnaeus, 1758)	Gallina
Phasianidae	
<i>Coturnix japonica</i> (Temminck & Schlegel, 1849)	Codorniz japonesa
Cardinalidae	

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Passerina caerulea (Linnaeus, 1758)
Passerina versicolor (Bonaparte, 1838)
Pheucticus chrysopleus (Vigors, 1832)
Pheucticus ludovicianus (Linnaeus, 1766)

Picogrueso azul
 Colorín morado
 Chorchá pico de loro
 Picogrueso pechirroza

Icteridae

Icterus gularis (Wagler, 1829)
Icterus pustulatus (Wagler, 1829)

Chorchá de altamira
 Chorchá rayada

Mimidae

Dumetella carolinensis (Linnaeus, 1766)
Mimus gilvus (Vieillot, 1808)

Ave gato gris
 Cenzontle mexicano

Momotidae

Eumomota superciliosa (Sandbach, 1837)
Momotus mexicanus (Swainson, 1827)

Mot-mot
 Momoto mexicano

Passerellidae

Peucaea ruficauda (Bonaparte, 1853)

Tatachico

Poliophtidae

Poliophtila albiloris (Sclater & Salvin, 1860)

Mishia

Thraupidae

Sporophila moreletii (Bonaparte, 1850)

Semillerito de cuello blanco

Troglodytidae

Campylorhynchus rufinucha (Lesson, 1838)

Porosoco

Turdidae

Turdus grayi (Bonaparte, 1838)

Cenzontle upayero

Tyrannidae

Myiarchus nuttingi (Ridgway, 1882)
Myiarchus tuberculifer (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837)
Myiozetetes similis (von Spix, 1825)
Pitangus sulphuratus (Linnaeus, 1766)
Tyrannus melancholicus (Vieillot, 1819)

Mosquerito de nuttingi
 Mosquerito de copete negro
 Mosquerito social
 Chepio
 Mosquerito melancólico

PICIFORMES

Picidae

Melanerpes aurifrons (Wagler, 1829)

Cheje

STRIGIFORMES

Strigidae

Glaucidium brasilianum (Gmelin, JF, 1788)

Aurorita

Prevalencia general

Empleando tanto la detección mediante frotos sanguíneos como mediante PCR, un total de 180 muestras de sangre de 33 especies de aves fueron analizadas en busca de presencia de parásitos de malaria aviar. De ellas, 68 muestras (38%) fueron positivas para malaria aviar; 43 (63%) albergaron parásitos del género *Plasmodium* y 23 (34%) albergaron parásitos del género *Haemoproteus*. Del total de muestras, dos presentaron doble infección por *Plasmodium* y *Haemoproteus*. Las infecciones dobles se encontraron en una chorcha de altamira (*Icterus gularis* (Wagler, 1829)) y en un turco (*Eumomota superciliosa* (Sandbach, 1837)). Ninguna muestra fue positiva para parásitos del género *Leucocytozoon*.

En relación a la prevalencia de malaria en gallinas, la prevalencia fue del 41% (12 individuos positivos de 31 muestreados). En los casos positivos, 10 infecciones fueron a causa de *Plasmodium* y 2 por *Haemoproteus*.

Niveles generales de parasitemia

Para el estudio se obtuvieron 209 láminas de frotos sanguíneos de los 194 individuos muestreados (para algunos individuos se generaron más de dos láminas con frote sanguíneo). Del total de láminas generadas, 34 resultaron positivas para malaria aviar después de la inspección al microscopio. En términos generales, poco más de dos tercios de estas muestras (66%) fueron diagnosticadas con un nivel moderado de parasitemia mientras que para las demás categorías no tuvieron más del 1/3 del total de muestras (Tabla 2).

Tabla 2

Valores numéricos de parasitemia, nivel categórico de parasitemia (baja, media o alta) (según Santiago-Alarcón y Carbó-Ramírez, 2015 y Ishtiaq et al. 2017) y género de hemosporidio identificado en los individuos que resultaron positivos a malaria aviar durante el análisis de frotos sanguíneos a través del microscopio en el presente estudio

No.	Familia	Especie	Género de hemosporidios detectado	Nivel de parasitemia	Nivel categórico de parasitemia
1	Icteridae	<i>Icterus pustulatus</i> (Wagler, 1829)	<i>Haemoproteus</i>	0.0015	Moderada
2	Icteridae	<i>Icterus pustulatus</i> (Wagler, 1829)	<i>Haemoproteus</i>	0.158	Alta
3	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Haemoproteus</i>	0.0030	Moderada
4	Turdidae	<i>Turdus grayi</i> (Bonaparte, 1838)	<i>Haemoproteus</i>	0.0020	Moderda
5	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Plasmodium</i>	0.0030	Moderada

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

6	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Haemoproteus</i>	0.010	Moderada
7	Mimidae	<i>Mimus gilvus</i> (Vieillot, 1808)	<i>Haemoproteus</i>	0.0060	Moderada
8	Icteridae	<i>Icterus gularis</i> (Wagler, 1829)	<i>Plasmodium</i>	0.0053	Moderada
9	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Haemoproteus</i>	0.018	Moderada alta
10	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Haemoproteus</i>	0.0026	Moderada
11	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Plasmodium</i>	0.0025	Moderada
12	Trochilidae	<i>Amazilia rutila</i> (Delattre, 1843)	<i>Haemoproteus</i>	0.0008	Baja
13	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Haemoproteus</i>	0.0005	Baja
14	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Haemoproteus</i>	0.0016	Moderada
15	Passerellidae	<i>Peucaea ruficauda</i> (Bonaparte, 1853)	<i>Plasmodium</i>	0.0091	Moderada
16	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Haemoproteus</i>	0.008	Moderada
17	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Plasmodium</i>	0.0017	Moderada
18	Cardinalidae	<i>Passerina versicolor</i> (Bonaparte, 1838)	<i>Plasmodium</i>	0.0039	Moderada
19	Tyrannidae	<i>Tyrannus melancholicus</i> (Vieillot, 1819)	<i>Plasmodium</i>	0.005	Moderada
20	Turdidae	<i>Turdus grayi</i> (Bonaparte, 1838)	<i>Plasmodium</i>	0.017	Moderada alta
21	Columbidae	<i>Columbina passerina</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Haemoproteus</i>	0.0012	Moderada
22	Columbidae	<i>Columbina passerina</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Plasmodium</i>	0.010	Moderada alta
23	Columbidae	<i>Columbina passerina</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Plasmodium</i>	0.0141	Moderada alta
24	Columbidae	<i>Columbina passerina</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Haemoproteus</i>	0.0035	Moderada
25	Columbidae	<i>Columbina passerina</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Plasmodium</i>	0.0024	Moderada
26	Cardinalidae	<i>Pheucticus chrysopleplus</i> (Vigors, 1832)	<i>Haemoproteus</i>	0.016	Moderada alta
27	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Plasmodium</i>	0.012	Moderada alta
28	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Plasmodium</i>	0.0029	Moderada
29	Turdidae	<i>Turdus grayi</i> (Bonaparte, 1838)	<i>Haemoproteus</i>	0.0057	Moderada
30	Icteridae	<i>Icterus pustulatus</i> (Wagler, 1829)	<i>Haemoproteus</i>	0.0046	Moderada
31	Columbidae	<i>Columbina inca</i> (Lesson, 1847)	<i>Haemoproteus</i>	0.0021	Moderada
32	Columbidae	<i>Columbina passerina</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Plasmodium</i>	0.0008	Baja
33	Picidae	<i>Melanerpes aurifrons</i> (Wagler,	<i>Plasmodium</i>	0.065	Moderada alta

		1829)				
34	Tyrannidae	<i>Myiarchus tuberculifer</i> (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837)	<i>Plasmodium</i>	0.0044	Moderada	

Los valores numéricos de parasitemia reportados para ambos géneros de hemosporidios fueron similares, y únicamente un individuo infectado con *Haemoproteus* y otro con *Plasmodium* mostraron valores que discrepan de los del resto de muestras positivas para la presencia de estos parásitos (Tabla 2 y Figura 2).

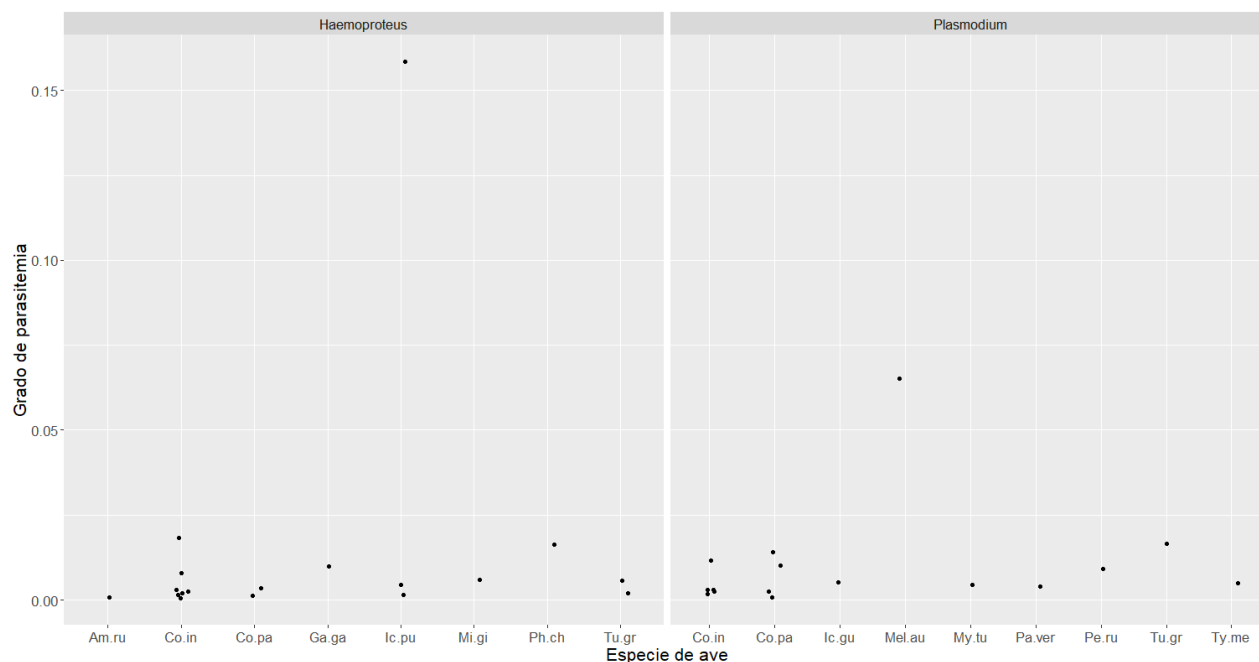


Figura 2. Nivel de parasitemia según la especie de ave muestreada y el género de hemosporidio (*Haemoproteus* y *Plasmodium*) detectado en los frotis sanguíneos elaborados para este estudio. El nombre de las especies se encuentran abreviados de la siguiente manera: Ty.me= *Tyrannus melancholicus*, Tu.gr= *Turdus grayi*, Ph.ch= *Pheucticus chrysopheplus*, Pe.ru= *Peucaea ruficauda*, Pa.ver= *Passerina versicolor*, My.tu= *Myiarchus tuberculifer*, Mi.gi= *Mimus gilvus*, Mel.au= *Melanerpes aurifrons*, Ic.pu= *Icterus pustulatus*, Ic.gu= *Icterus gularis*, Ga.ga= *Gallus gallus*, Co.pa= *Columbina passerina*, Co.in= *Columbina inca* y Am.ru= *Amazilia rutila*.

Prevalencia y nivel parasitemia de parasitemia de malaria aviar según el tipo de hábitat

Obtuvimos 92 muestras sanguíneas en áreas rurales y 86 en sitios urbanos. Considerando todos los datos, la prevalencia fue ligeramente mayor para las áreas rurales que para las urbanas (Fig. 3). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas de prevalencia entre hábitats ($p=0.8775$).

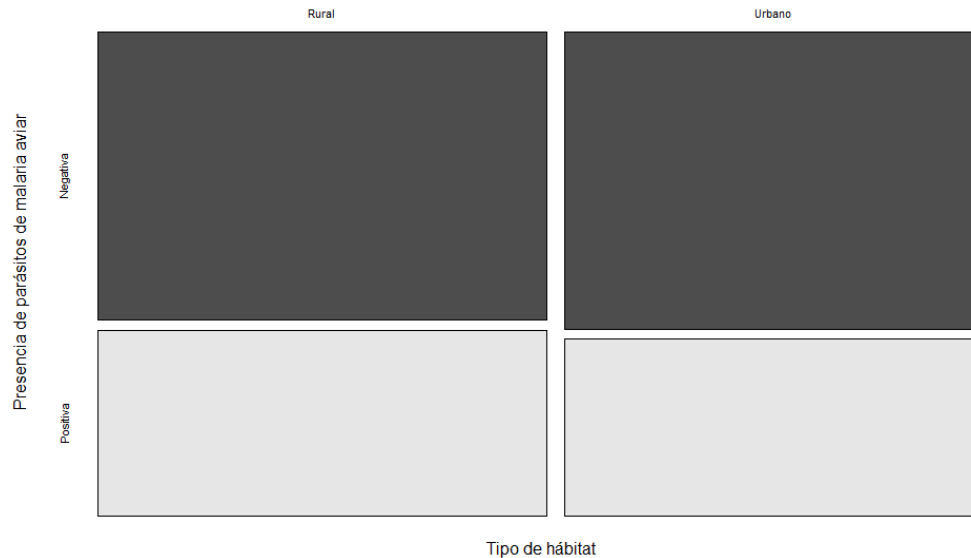


Figura 3. Gráfico de mosaico de Fisher para los datos de prevalencia de malaria aviar de aves muestreadas según el tipo de hábitat (rural o urbano) en el que se obtuvieron las muestras.

Por otro lado, los resultados del GLM indican que las aves tienen una mayor probabilidad de infección por malaria aviar en ambientes rurales en comparación con los ambientes urbanos, aunque este factor muestra ser pequeño (Tabla 3). Además, la estación del año (seca o lluviosa) no mostró efecto sobre la probabilidad de infección por malaria en las aves analizadas en este estudio.

Tabla 3

Resultado del modelo lineal generalizado (binomial) de la probabilidad de infección en relación al tipo de hábitat donde se encuentran las aves del sitio de estudio. Se evaluaron las variables explicativas hábitat (rural o urbano) y estación (seca y lluviosa), únicamente hábitat fue significativa por lo que se retiró del modelo la variable estación

	Estimate	SE	Z value	p
(Intercept)	-0.44183	0.21362	-2.068	0.0386
Hábitat Urbano	-0.08142	0.30887	-0.264	0.7921
Adds ratio	(Intercept) habitatUrbano 0.6428571 0.9218107			

Null deviance: 236.76 on 177 degrees of freedom
 Residual deviance: 236.69 on 176 degrees of freedom
 AIC: 240.69
 Number of Fisher Scoring iterations: 4

Tomando en cuenta tanto las aves silvestres como de traspatio, la proporción de casos positivos para *Haemoproteus* fue mayor en sitios rurales en comparación con los urbanos (Fig. 4), y se encontró diferencia significativa entre ambos tipos de hábitat ($p= 0.0007368$). Para el género *Plasmodium*, la prevalencia de casos positivos fue mayor para áreas urbanas, y se encontró mayor proporción estadísticamente significativa en este tipo de hábitat ($p= 0.03567$).



Figura 4. Gráfico de mosaico de Fisher para los datos de prevalencia de malaria aviar por género en las aves muestreadas en dos distintos tipos de hábitat (rural o urbano) para el estudio.

La proporción de aves de corral (incluyendo las cautivas en jaula) y gallinas de traspatio positivas para malaria entre tipos de hábitat es similar, y no se encontró diferencias significativas entre ellas ($p=1$). Al evaluar la prevalencia de malaria en gallinas de traspatio (*Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)) se observó una proporción un poco mayor de positivos en ambientes urbanos (Fig. 5). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p= 0.4725$).

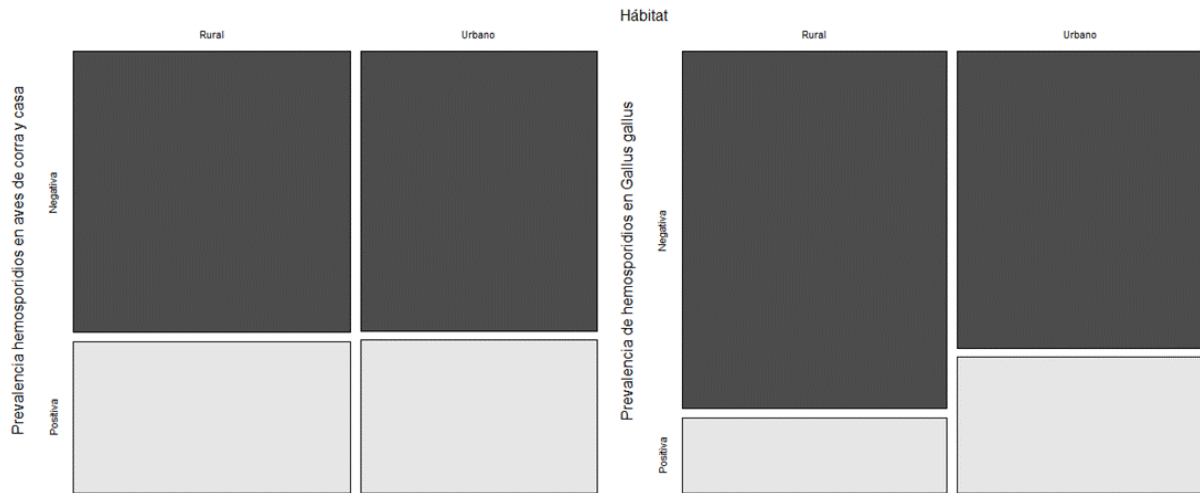


Figura 5. Gráfico de mosaico de Fisher para los datos de prevalencia de malaria aviar en aves de corral (todas las aves cautivas y de corral) y gallinas de traspatio (solo de la especie *Gallus gallus*) por tipo de hábitat (rural o urbano).

Nivel de parasitemia de malaria aviar en aves según el tipo de hábitat

Como se observa en la Figura 6, los valores promedio de parasitemia en los sitios urbanos tuvieron un error menor en comparación que en los sitios urbanos. Estos valores de parasitemia no se diferenciaron significativamente según el tipo de hábitat (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 0.24381$, $df = 1$, $p = 0.6215$).

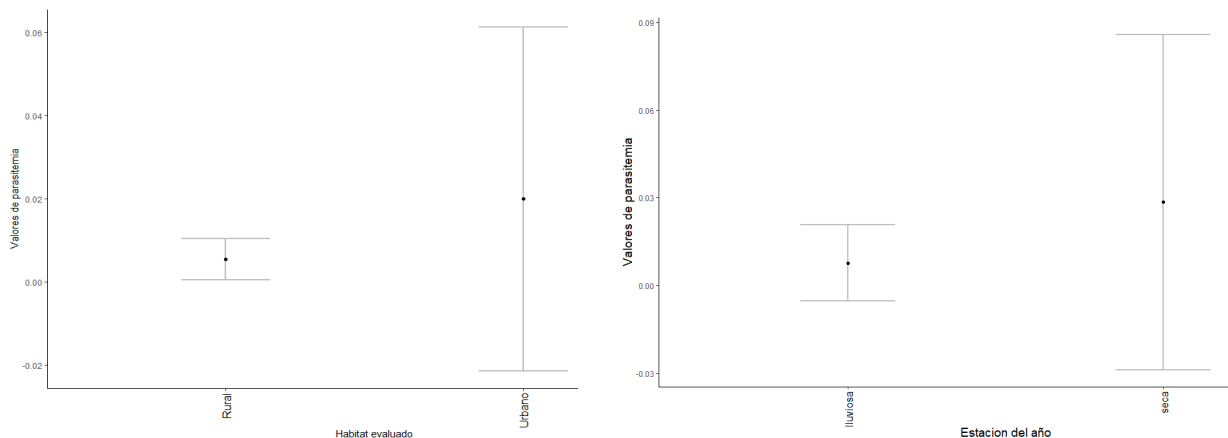


Figura 6. Valor medio y barras de error para los valores de parasitemia de las aves evaluadas por tipo de hábitat (a) y por estación del año (b).

El modelo lineal generalizado tampoco señaló efecto significativo del tipo de hábitat en el nivel de parasitemia para las aves del sitio de estudio ($p < 0.05$). Con relación a la estación del año, los valores de parasitemia mostraron mayor error en ambientes urbanos (Fig. 6). No obstante, tampoco

se encontró diferencia en el valor de parasitemia según la época del año (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 1.5325$, $df = 1$, $p = 0.2157$).

Por su parte, el GLM indica un efecto, aunque leve, de la estacionalidad sobre la carga parasitaria y revela que durante la estación lluviosa el nivel de parasitemia es menor (Tabla 4).

Tabla 4

Resultado del modelo lineal generalizado (binomial) del nivel de parasitemia con relación a la estación del año. Se evaluaron las variables explicativas hábitat (rural o urbano) y estación (seca y lluviosa), únicamente la estación del año fue significativa por lo que se retiró del modelo final

	Estimate	SE	t value	p
(Intercept)	-4.859	2.288	-2.124	0.0337 *
Estación seca	1.327	3.226	0.411	0.6807

Null deviance: 0.91555 on 31 degrees of freedom

Residual deviance: 0.75586 on 30 degrees of freedom

AIC: 4.7903

Diversidad de aves silvestres potenciales hospederas de malaria aviar y niveles de prevalencia y parasitemia en aves del sitio de estudio

Los datos indican un valor general de diversidad mayor para áreas rurales ($H=3.51$) en comparación con las urbanas ($H=3.39$). Los índices muestran que la diversidad general es similar entre los sitios de estudio. De estos, el valor más alto de diversidad se registró para el ICTA y los valores más bajos para la Aldea Sinaneca (Tabla 5).

Tabla 5

Riqueza, valores de diversidad (H =Shannon y S =Simposon) y nivel de prevalencia de malaria aviar según el sitio de muestreo del área de estudio

N	Sitio de muestreo	Hábitat	Riqueza	H	S	Prevalencia para el sitio
1	Aldea Sinaneca	rural	14	2.32	0.87	0.14
2	Barrio La Reforma	urbano	17	2.52	0.89	0.5
3	El Guayabal	rural	20	2.64	0.9	0
4	El Terrero	urbano	16	2.34	0.87	0.57
5	Finca Adrián Salguero y familia	urbano	20	2.67	0.90	1
6	Finca Brían López	rural	23	2.85	0.92	0
7	Finca Carlos Vargas	urbano	27	2.90	0.92	0
8	Finca Emerio Portillo	rural	23	2.88	0.93	0.14
9	Finca Jairo Trabanino	rural	21	2.79	0.92	0.4
10	Hacienda Don José, Colonia el Valle, Zacapa	urbano	20	2.77	0.92	0

11	ICTA	urbano	27	2.98	0.94	0.5
12	Parque Regional Municipal El Castillo	rural	19	2.43	0.88	0.5
13	Parque Regional Municipal Niño Dormido	rural	21	2.84	0.93	0.33
14	Reserva Natural Privada Heloderma	rural	25	2.85	0.92	0.5
15	San Pablo	rural	21	2.86	0.93	0.5

La prevalencia de parásitos de malaria aviar (analizados juntos), se correlacionó negativamente con el nivel de riqueza y el índice de Shannon (Fig. 7), aunque ninguna de las correlaciones fue estadísticamente significativa ($p=0.3$ y $p=0.45$). El hecho de que la prevalencia de los parásitos tenga una correlación negativa con la riqueza y diversidad de aves potenciales hospederas sugiere que en este caso una mayor diversidad de especies hospedantes se asocia con prevalencias más bajas en el área de estudio.

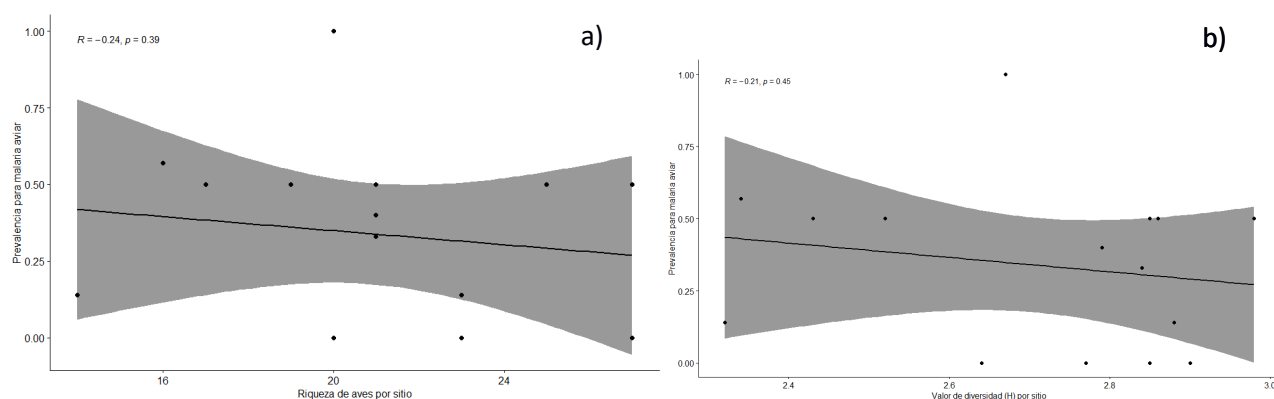


Figura 7. Graficas de correlación de la riqueza (a) y la diversidad de aves (índice de Shannon=H) (b) por sitio y la prevalencia de malaria aviar para cada sitio en el área de estudio.

Relación parasitemia con riqueza diversidad

Los datos mostraron que el grado de parasitemia encontrado en las aves analizadas no está relacionada con la riqueza, diversidad (Fig. 8) o con la abundancia general (número total de registros de individuos por sitio y por muestreo) de las aves potenciales hospederas en el sitio de estudio (Fig. 9).

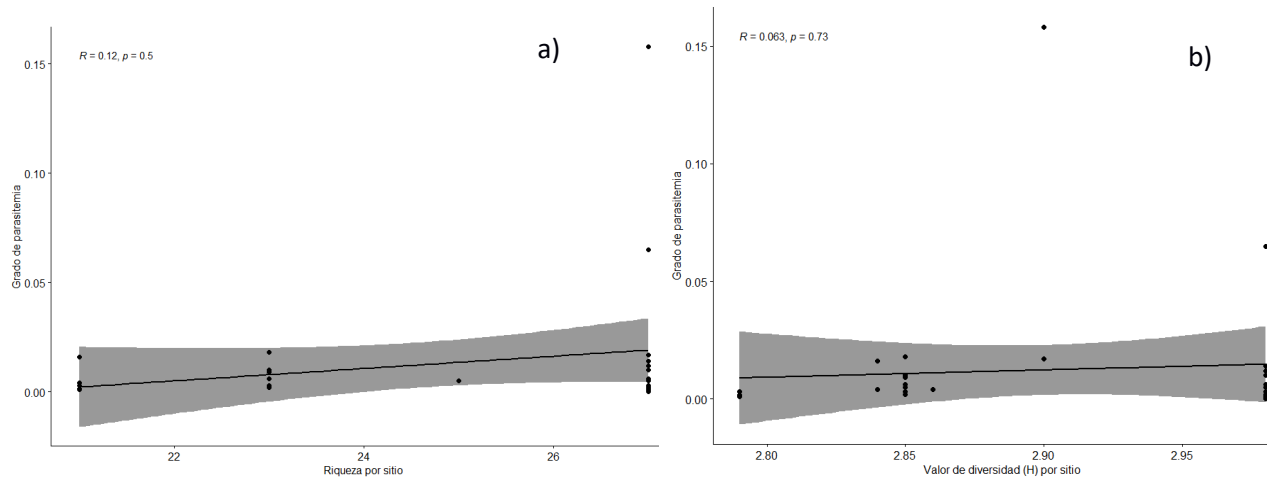


Figura 8. Gráfica de correlación entre la riqueza (a) y la diversidad de aves (índice de Shannon =H) (b) por sitio de muestreo y el grado de parasitemia de malaria aviar en el área de estudio.

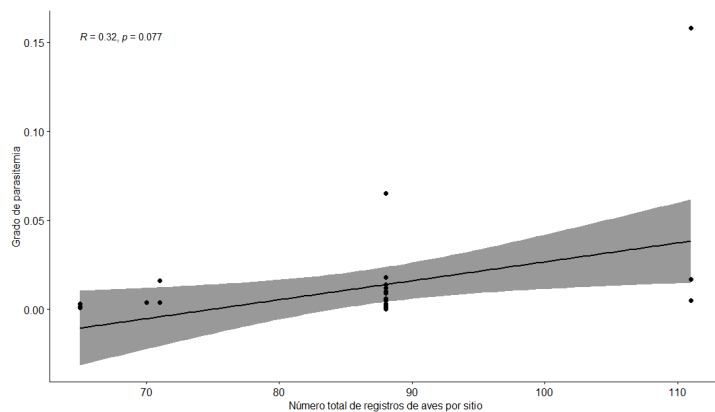


Figura 9. Gráfica de correlación entre el número total de registros de las aves por sitio de muestreo y el grado de parasitemia general de malaria aviar por sitio.

Prevalencia según especie y familia de ave capturada para este estudio

En este estudio no fue posible hacer comparaciones de prevalencia de malaria aviar entre especies de aves hospedadoras debido a que capturamos menos de diez individuos para la mayoría de ellas (se obtuvieron diez o más registros únicamente para cuatro especies).

Para la mayoría de familias de aves para las que se obtuvieron registros, se capturaron menos de 10 individuos (Tabla 6). Los valores de prevalencia de malaria aviar en estas familias variaron de entre 0 hasta 44%. Únicamente para cuatro familias (Columbidae, Phasianidae, Turdidae y Tyrannidae), el número de representantes superó los doce individuos. Para estas cuatro familias el nivel de prevalencia fue en promedio del 35%.

Tabla 6

Número de individuos capturados, diagnóstico para presencia de malaria aviar y valor de prevalencia para las familias de aves capturadas en el presente estudio

Familia de aves	Número de individuos capturados	Diagnóstico de presencia de parásitos de malaria aviar		Valor de prevalencia
		Negativos	Positivos	
Anatidae	5	4	1	20.0
Cardinalidae	7	2	5	71.4
Columbidae	56	31	25	44.6
Cuculidae	6	6	0	0.0
Icteridae	7	1	6	85.7
Mimidae	3	1	2	66.7
Momotidae	8	5	3	37.5
Passerellidae	4	3	1	25.0
Phasianidae	31	19	12	38.7
Phasianidae	1	1	0	0.0
Picidae	2	1	1	50.0
Poliophtidae	7	5	2	28.6
Strigidae	2	2	0	0.0
Thraupidae	1	1	0	0.0
Trochilidae	2	1	1	50.0
Troglodytidae	6	5	1	16.7
Turdidae	13	8	5	38.5
Tyrannidae	17	14	3	17.6

De estas cuatro familias, la familia Columbidae y Phasianidae presentaron los valores más altos de prevalencia (Tabla 6 y Fig. 11). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en los niveles de prevalencia entre estas cuatro familias para el área de estudio ($P = 0.2566$).



Figura 10. Gráfico de mosaico de Fisher para los datos de prevalencia de malaria aviar por familia de aves capturadas durante el presente estudio.

10.2 Discusión de resultados

Prevalencia general de infección por malaria aviar en aves silvestres y de traspatio

El análisis de la prevalencia de parásitos es una medida fundamental requerida para comprender las variaciones temporales y espaciales y la epidemiología de las enfermedades infecciosas (Wood et al., 2007). En el caso de la malaria aviar, la prevalencia en distintas comunidades de aves alrededor del mundo es muy variable; desde valores del 12% (Valkiunas, 2004) en Costa Rica hasta del 79% en África (Lutz et al. 2015).

En este estudio, la prevalencia fue relativamente alta con más de un tercio (38%) de infectados con al menos un género de parásitos sanguíneos causantes de malaria aviar. Este valor es comparable al de otras comunidades de aves del continente como Nuevo México con un 34.9% de infecciones (de 186 muestras), California (con 39.8% de 399 aves) y 40% en Pichincha, Ecuador (con 180 individuos analizados) (Bahamonde-Vinueza, 2014). Además, es similar también al encontrado en otros estudios en la región neotropical donde se usaron análisis moleculares para la detección de estos parásitos (Belo et al. 2009; Santiago-Alarcón et al. 2010; Belo et al. 2011).

Por otro lado, este nivel de prevalencia es considerablemente menor al reportado en otros estudios en bosques más húmedos de Sur América como en la amazonia peruana, con 60.1% de las aves infectadas (de 281 muestras) (Gálvez-Zagaceta et al, 2021). Además, la prevalencia que se encontró es similar a la reportada en otras áreas áridas del continente. Por ejemplo, en su estudio, Belo et al. (2012) encontraron una prevalencia general de 41% de las aves en una zona árida del norte de Venezuela.

Los datos de prevalencia recabados en este estudio se suman a los obtenidos en algunas otras áreas áridas o semiáridas de la región Mesoamericana, que muestran que la infección por malaria en aves silvestres y/o de corral no es necesariamente baja para este tipo de hábitat como se había señalado anteriormente (Tella et al. 1999, Valera et al. 2003).

Prevalencia por género de hemosporidio identificado

En este estudio, *Plasmodium* tuvo mayor prevalencia que *Haemoproteus*. Esta composición es similar a la reportada en otros estudios en América. Por ejemplo, Walter et al. (2016) encontró mayor prevalencia de *Plasmodium* en comparación con los otros dos géneros de hemosporidios (*Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) en una comunidad de passeriformes de California. Sin embargo, otros estudios como el de Marroquín-Flores, (et al. 2017) o el de Bello et al. (2012) reportan mayor prevalencia para *Haemoproteus* en comparación con *Plasmodium*.

Mayor incidencia de infecciones por *Plasmodium* en comparación con las infecciones por *Haemoproteus* en esta zona semiárida podría deberse a la abundancia relativa de los vectores que transmiten estos parásitos. En general, se sabe que distintas especies de mosquitos (Culicidae) de diferentes géneros transmiten parásitos del género *Plasmodium*. *Haemoproteus* se transmite 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 (Santiago-Alarcón et al. 2012). La presencia y abundancia de distintas especies de estos grupos de mosquitos podría tener implicaciones en la prevalencia de cada uno de estos parásitos. Sin embargo, debido a que hasta el momento se

desconoce la diversidad y abundancia de dípteros potenciales vectores de malaria aviar en las áreas semiáridas de Centro América poco se puede concluir sobre su papel en la prevalencia de estos parásitos.

Por otro lado, en este estudio no se detectaron infecciones por *Leucocytozoon*. Esto no sorprende pues generalmente la prevalencia de este género en la región neotropical es baja (Valkiūnas 2005; Forrester y Greiner 2008). Niveles altos de prevalencia y diversidad de este género son comunes de encontrar en la región Neártica (Greiner et al. 1975). No obstante, existen algunos estudios que han reportado alta prevalencia de este género en el Neotrópico principalmente en áreas a mayor altitud. Al parecer, existe una relación entre este factor y la presencia del género. En su trabajo, Merino et al. (2008) propusieron la latitud como uno de los factores que explican mejor la distribución de este género en Sur América. Esto se ha relacionado con los insectos vectores que lo transmiten que tienen mayor diversidad a partir de altitudes medias. Además, debido a que muchas especies de estos insectos usan pequeños arroyos torrenciales para su reproducción, su distribución suele ser aún más restringida.

Para este estudio solo podemos especular que la falta de registros para este género se puede deber, en parte, a la baja altitud a la que se encuentra el Valle del Motagua, la cual podría no favorecer la presencia de los insectos vectores de este género. En relación a esto, un estudio sobre prevalencia de malaria en la Unión Zacapa, en Sierra de las Minas, con sitios ubicados a 1,550 msnm, tampoco detectó infecciones por *Leucocytozoon* (datos no publicados, Conv.Per. Dra. Rosa Alicia Jiménez). Será necesario, por lo tanto, realizar mayor número de estudios sobre prevalencia de esta enfermedad en un gradiente altitudinal más amplio (e.g. desde las tierras bajas del Valle del Motagua hasta sitios a mayor altitud como Sierra de las Minas, Sierra de Chuacus o Montañas cernas como Las Granadillas). Esto permitirá entender mejor el papel de la altitud en la prevalencia de malaria aviar en la región de oriente del país.

Los resultados de este estudio también muestran un número bajo de infecciones mixtas. Las infecciones mixtas, o sea la presencia de dos o más parásitos de malaria aviar en un mismo individuo, suelen ser bajas en distintas áreas de América. En su estudio, Marroquín-Flores, et al. (2017) analizaron 186 muestras, y reportaron únicamente dos infecciones mixtas compuestas por *Leucocytozoon* con *Plasmodium*, doce de *Leucocytozoon* con *Haemoproteus*, dos de *Haemoproteus* con *Haemoproteus* y una de *Plasmodium* con *Plasmodium*.

En relación a la prevalencia de malaria en gallinas, encontramos una prevalencia alta, de 41%. Los valores de prevalencia para este grupo de aves varían marcadamente dependiendo del área, incluso pueden ser del 100% en algunas áreas de América (Santos-Prezoto et al. 2004). La alta prevalencia que encontramos en este estudio coincide con lo encontrado en un estudio realizado en La Gomera, Escuintla, en el que se reportó una prevalencia del 88% para las aves tecnificadas y 76% para aves de traspatio. En este último estudio, la mayoría de infectados presentaron parásitos de *Plasmodium* y únicamente un individuo presentó al género *Haemoproteus* (Arocha-López, 2018). Esto es similar a lo encontrado en el presente estudio, donde sólo el 17% de los infectados presentaron parásitos del género *Haemoproteus*.

La alta prevalencia encontrada en las aves silvestres y de traspatio de la región de estudio es interesante pues estos parásitos reducen la aptitud de sus huéspedes y pueden constituir una fuerte

fuerza selectiva que opera dentro de las poblaciones naturales (Lefèvre et al. 2008) de aves de crianza. En el caso de las aves de corral, esto tiene además un impacto importante en la economía y en la seguridad alimentaria, principalmente en las personas de comunidades rurales que generalmente se encuentran en una situación económica más precaria.

Valores de prevalencia de malaria aviar según el método de análisis de muestras

Varios estudios realizados en la región Neotropical donde se emplearon análisis moleculares han reportado una alta prevalencia de malaria aviar (Belo et al. 2009; Santiago-Alarcón et al. 2010; Bello et al. 2012). Por el contrario, algunos estudios que únicamente han examinado la presencia de estos parásitos mediante un análisis de frotis de sangre han informado una baja prevalencia (de aproximadamente 10%) (Greiner et al. 1975; Winchell, 1978; Bennett et al. 1991; Rodríguez y Mata, 2001). En su estudio, Rhim (2018) reportó un 10% más de resultados positivos a *Plasmodium* y *Haemoproteus* en aves silvestres utilizando PCR en comparación con los frotis sanguíneos evaluados bajo el microscopio.

En este estudio, el número de infecciones positivas detectadas mediante PCR fue distinto al reportado por análisis de microscopía, consistentes con estudios previos que han comparado los dos métodos (Moens y Pérez-Tris., 2016; Valkiunas et al., 2018). Las diferencias en detección de hemosporidios con estos dos métodos suelen ocurrir debido a dos razones principales. En primer lugar, la PCR puede identificar una infección positiva con menos de un solo parásito por millón de células huésped (Hellgren et al. 2004), infecciones poco probables de detectar en exámenes microscópicos estándar de 10,000 a 100,000 células (Atkinson et al., 2000). En segundo lugar, es posible que las infecciones detectadas por PCR logren ser combatidas y que no se conviertan en fases que se muevan por el torrente sanguíneo de las aves (Valkiunas et al., 2013). Debido a lo anterior, es necesario realizar mayor número de estudios sobre la efectividad de detección de ambos métodos. Estudios como el presente, no solo son útiles para obtener más información sobre las comunidades de parásitos en ecosistemas tropicales del Neotrópico si no que generan datos comparativos entre métodos de análisis para evaluar poblaciones de parásitos sanguíneos.

Por otra parte, el género *Haemoproteus* fue mucho diagnosticado con mayor facilidad, y generó menor número de falsos negativos, en láminas en comparación con *Plasmodium*. En el caso de este último, varias muestras que fueron positivas en PCR fueron diagnosticadas como negativas en lámina. Estas diferencias de detección pueden deberse a algunas diferencias morfológicas y de ciclo reproductivo de ambos géneros. En el caso de *Haemoproteus*, el período prepatente dura en promedio 11 días, lo cual facilita su diagnóstico pues es posible coincidir con mayor frecuencia con estadios de segunda generación de merontes y merozoitos maduros que son en general más fáciles de observar. Por el contrario, las especies del género *Plasmodium*, como *Plasmodium lenticulum*, tienen un período prepatente de alrededor de 120 horas o menos. Esto último, dificulta su diagnóstico en microscopía de frotis sanguíneos (Dimitrov et al., 2015; Valkiunas, 2005).

Cuando el período prepatente de estos parásitos ha culminado, los gametocitos libres son más difíciles de observar en frotis sanguíneos de muestras de sangre venosa. Por ello, el manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2008) indica que los glóbulos rojos con merozoitos maduros y los gametocitos libres son más pesados que los glóbulos rojos sanos y por lo tanto es más

común encontrarlos en sangre periférica, por lo que sugiere hacer comparación con sangre periférica para confirmar el diagnóstico en frotis sanguíneos.

Finalmente, Mukhin et al. (2016) sugieren que niveles bajos de parasitemia en individuos positivos para malaria en estudios con captura con redes de niebla (como en el caso de este estudio), puede deberse a un sesgo relacionado con este método de captura. Estos autores, y otros como Holmstad et al. (2006), mostraron que niveles muy altos de parasitemia en aves silvestres reduce considerablemente su capacidad de movilidad. Esto a su vez reduce la probabilidad de captura de estos individuos en las redes. En este mismo estudio, que duró tres años, predominó una carga de parasitemia baja, y solo un individuo de 1,854 examinados mostró un grado alto de parasitemia. En nuestro caso, en concordancia con este último, solo un individuo presentó un grado alto de parasitemia. Los autores señalaron que las poblaciones de aves seguramente se ven afectadas por malaria con mayor frecuencia y severidad en condiciones naturales y que seguramente los individuos con cargas parasitarias más altas mueren o nunca son registrados.

Niveles de parasitemia generales para las aves evaluadas

En términos generales, la mayoría de aves infectadas con algún parásito de malaria aviar en este estudio (66% de ellos) presentaron un nivel moderado de parasitemia y una baja proporción mostro niveles moderados altos o altos. En este respecto, Dimitrov et al. (2015) indican que, muchas veces, los protozoos parásitos sanguíneos suelen mantener niveles intermedios y bajos de parasitemia en sus hospederos debido principalmente a la resistencia del hospedero, lo que a su vez favorece la sobrevivencia del protozoo en determinadas poblaciones y a través del tiempo. Además, como señala Valkiūnas (2005), en poblaciones de aves silvestres infectadas principalmente con parásitos como *Plasmodium spp.*, como es el caso para este estudio, la parasitemia leve (crónica) de infecciones parece predominar en la mayoría de individuos.

En cuanto a las aves silvestres, la mayoría presentó un nivel de parasitemia de bajo a moderado. Muchas de las aves muestreadas en este estudio, con niveles bajos o medios de parasitemia, son considerados por algunos autores como hospedadores de hemosporidios en condiciones crónicas (como la familia Columbidae y algunas familias del orden Passeriformes). Estos grupos de aves silvestres favorecen la sobrevivencia del parásito en algunas poblaciones. Sin embargo, algunas de estas especies sí podrían ser vulnerables a los hemosporidios circulantes según distintas condiciones propias de los hospederos (Dadam et al., 2019; Dimitrov, 2015).

Algunas muestras de aves columbiformes y passeriformes de este estudio mostraron condiciones infecciosas activas. Por ejemplo, algunos individuos mostraron merontes de segunda generación en sangre y otras como la chorcha barrada (*Icterus pustulatus* (Wagler, 1829)) tuvieron incluso un nivel de parasitemia alto. En este último individuo, el frote mostró estadios avanzados del parásito (ookinetos libres). Las dos fases de desarrollo mencionadas anteriormente son estadios necesarios para que ocurra la transmisión de estos parásitos a los vectores, lo que contribuye a completar el ciclo de vida del parásito (Valkiūnas, 2005). Estos resultados muestran que la enfermedad se encuentra circulante de forma activa en la población de aves silvestres del área de estudio.

Acerca de las aves de corral, de las 37 muestras analizadas (entre gallinas, patos y palomas), fue posible determinar el grado de parasitemia únicamente para un individuo, una gallina. Aunque el análisis de PCR indicó la presencia de parásitos en trece de estas muestras, el análisis de los frotis al

microscopio permitió detectar una sola de estas infecciones. Esto era de esperarse pues este método en general posee una baja sensibilidad de detección de esta enfermedad, principalmente cuando el nivel de parasitemia en la muestra es pequeño (entre 1 a 10 parásitos por microlitro) (Ishtiaq et al., 2017). A pesar de esto, esta técnica es de las pocas que permite hacer una estimación del grado de infestación por parásitos sanguíneos en aves. Asimismo, permite estudiar detalles morfológicos y etapas parasitarias de estos animales. Los datos a mediano o largo plazo recabados por este método también permiten comprender el comportamiento de la enfermedad a nivel poblacional (Manual de OIE, 2008).

También es posible que el tiempo que se empleó para analizar las muestras no fuera adecuado para establecer infecciones en este grupo de aves. Alarcón y Carbó-Ramírez (2015) recomiendan hacer una lectura de al menos 10,000 células roja con el fin de incrementar la probabilidad de detección de los parásitos cuando el grado de parasitemia es bajo (nosotros empleamos 30 minutos para la clasificación de la muestra como positiva o negativa, al ser la primera, se realizaba conteo de glóbulos rojos infectados y glóbulos rojos en 10 campos oculares). Esto al parecer es particularmente importante en el caso de *G. gallus* ya que algunos estudios indican que esta especie es altamente resistente al proceso infeccioso por malaria y que por eso en otros estudios epidemiológicos su función como especie hospedadora ha sido la hipótesis más considerada (Ibrahim y Al-Rubaie, 2020).

Además, Alarcón y Carbó-Ramírez (2015) sugieren qué si fue necesario llegar a leer 10,000 células rojas para considerar positiva a la muestra, está debe considerarse con un nivel bajo de parasitemia. Otra situación importante es que el PCR indicó que 12 de estas 13 muestras diagnosticadas en lámina como “negativos”, presentan parasitación por *Plasmodium*, particularmente difícil de diagnosticar cuando se tiene poca experiencia microscópica como se discutió anteriormente. En nuestro caso, es probable que los falsos negativos detectados en las láminas con frotos sanguíneos se presentarán en muestras con niveles bajos de parasitemia.

Prevalencia según el tipo de hábitat en las aves muestreadas

Aunque no son abundantes, existen varios estudios que han evaluado la prevalencia de malaria aviar en hábitas naturales y más urbanizados. Algunos de estos trabajos han registrado menor prevalencia de esta enfermedad en zonas urbanas (Evans et al., 2009; Santiago-Alarcón et al., 2020), otros han reportado mayor prevalencia en áreas no urbanas (Belo et al., 2011; Hernández-Lara et al., 2017; Tinajero et al., 2019), y otros, no han encontrado diferencias de prevalencia entre estos tipos de hábitat (Bichet et al., 2014; Ferraguti et al., 2018; Jiménez-Peñuela et al. 2019).

Curiosamente, en nuestro estudio no encontramos diferencias de prevalencia entre sitios rurales y urbanos por lo que la hipótesis inicial de diferencias de prevalencia entre hábitats no se sustenta. Sin embargo, los modelos predictivos indican que las aves tienen una mayor probabilidad de infección por malaria aviar, aunque el efecto es leve, en ambientes rurales en comparación con ambientes urbanos. Esto es algo que se ha observado en otros estudios donde el riesgo de infección se reduce en ambientes urbanos y aumenta en los rurales. Por ejemplo, en su estudio, Evans et al. (2009) registró menor riesgo de infección para poblaciones del ave negra de Eurasia (*Turdus merula* Linnaeus, 1758) en distintas ciudades de Europa a diferencia de sitios más rurales muestreados en los alrededores. Sin embargo, observó un incremento de prevalencia sólo en tres ciudades, todas

ellas con grandes ríos u otros cuerpos de agua abiertos. Esto se asoció con el hecho de que estos cuerpos de agua proporcionan áreas ideales para la reproducción y mantenimiento de poblaciones de los vectores transmisores de los parásitos que causan la enfermedad.

Esto último podría explicar la mayor probabilidad de infección en áreas rurales en este estudio, ya que la mayoría de ellas, a diferencia de las urbanas, están cercanos a distintos cuerpos de agua, entre quebradas, ríos o nacimientos de aguas termales (e.g. las Fincas Emerio Portillo y Finca Carlos Vargas están cercanos al Río Motagua y afluentes de este río; los Parques Niño Dormido y Heloderma tienen dentro cuerpos de agua grandes, la aldea Sinaneca se encuentra cerca de una quebrada, entre otros). En este respecto, será necesario estudiar la abundancia de mosquitos y otros potenciales vectores de malaria en ambientes urbanos y rurales y relacionarlos con aspectos como la disponibilidad de cuerpos de agua para la reproducción de los vectores. Esto último contribuirá a entender mejor el papel de estos factores en la prevalencia de esta enfermedad en aves silvestres y de crianza.

Cabe resaltar también que en este estudio se encontraron diferencias de prevalencia por tipo de hábitat según el género de hemosporidio. *Haemoproteus* mostró mayor prevalencia en áreas rurales y *Plasmodium* en áreas urbanas. Estos resultados pueden explicarse de nuevo ser explicados por diferencias de abundancia sus vectores (en particular de mosquitos y moscas negras) en respuesta a las características de cada ambiente. También se puede relacionar con la composición de la comunidad de aves en cada tipo de hábitat, pues esto puede influir en la cantidad de hospederos que los parásitos pueden tener y que los vectores pueden picar (Ferraguti et al., 2018; Ricklefs et al., 2004, Jiménez-Peñuela et al. 2019).

Con relación a esto último, se sabe que las comunidades de aves en áreas urbanas suelen ser más generalistas y menos diversas y las de ambientes rurales suelen ser más heterogéneas y menos simplificadas. En consecuencia, debido a que el número de especies en ambientes urbanos puede reducirse en comparación con sitios más naturales o semiurbanos, la urbanización puede no solo afectar la prevalencia de parásitos sino también resultar en una menor riqueza de parásitos sanguíneos (Hernández-Lara et al., 2020). En nuestro caso, obtuvimos un valor de diversidad de aves más alto para áreas rurales en comparación con las urbanas. Esto por lo tanto podría influir la prevalencia de los parásitos debido a una posible influencia de la disponibilidad de hospederos para los vectores.

Además de las diferencias de distribución de los vectores o la disponibilidad de hospederos para estos vectores, algunas características intrínsecas de los hospederos pueden incidir en la prevalencia y nivel de parasitemia de hemosporidios de cierto género en distintas poblaciones de aves. Por ejemplo, algunas especies pueden ser más susceptibles fisiológicamente a las infecciones (Yorinks y Atkinson 2000), otras pueden tener distintas tasas de mortalidad por hemosporidios o presentar distintos niveles de sociabilidad (intra o interespecífica). Incluso el tipo de nido que empleen durante la reproducción puede afectar la prevalencia de estos parásitos (Merino et al. 2000)

En este estudio, la proporción de aves de corral (incluyendo las cautivas en jaula) y gallinas de traspato positivas para malaria fue similar entre tipos de hábitat. Además, la prevalencia de malaria únicamente en gallinas de traspato no difirió entre los ambientes urbanos y rurales. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otras dos áreas de bosque seco estacional de América, una en

Puerto Rico y otra en Venezuela, donde la prevalencia de malaria no varió significativamente según la estación (Fallon et al. 2004; Bel et al., 2012). Esto se debe probablemente a que las diferencias estacionales en la prevalencia de hemoparásitos ocurren con más frecuencia en regiones templadas (Weatherhead y Bennett, 1992; Hatchwell et al. 2000), donde la estacionalidad climática es más pronunciada, cuando la transmisión de los parásitos ocurre únicamente en los meses más cálidos del año (Atkinson, 1988).

Estudios como los realizados por Jiménez-Peñuela et al. (2021) donde se evaluó la prevalencia en función de distintos tipos de hábitat y a través del tiempo, sugieren que la prevalencia está muy ligada a los patrones de infección de cada género de parásito, probablemente relacionados con la composición y densidad de la comunidad de vectores que los transmiten. Los requisitos ambientales reproductivos específicos de los diferentes grupos de vectores implicados en la transmisión de cada parásito pueden variar en función de cambios en las condiciones climáticas según el año y las características del paisaje. Debido a esto, es evidente que los estudios longitudinales sobre patrones de infección por malaria aviar en diferentes hábitats son fundamentales para identificar su variación a través del tiempo y el espacio. Esto es de especial interés en áreas modificadas por el hombre, ya que las actividades humanas pueden influir, directa o indirectamente, en la composición de las comunidades de vectores y huéspedes, así como en la salud de las aves (Jiménez-Peñuela et al. 2021).

Nivel de parasitemia en las aves estudiadas según el tipo de hábitat

Para este estudio, hipotetizamos niveles más alto de parasitemia en las aves de áreas urbanas. Sin embargo, los datos no apoyan esta hipótesis e indican que el grado de parasitemia para ambos hábitats es similar. La mayoría de individuos analizados presentaron valores de parasitemia de bajos a moderados independientemente del tipo de hábitat. Estos datos sugieren que los hospederos de esta enfermedad en el lugar podrían encontrarse en etapas iniciales de la infección o que el parásito está generando infecciones crónicas en ellos (Lacorte et al. 2013).

A pesar de no encontrar diferencia según el tipo de hábitat evaluado, en el sector urbano fue posible observar algunos individuos con grados de parasitemia moderados altos a altos; lo que indica que la enfermedad está en circulación activa en estas áreas. Martínez-De la Puente y Ferraguti (2020) en su estudio epidemiológico sobre la ecología de la transmisión de malaria aviar suponen la presencia de infecciones con parasitemia alta en ciertos individuos de una población favorece la transmisión de estos parásitos a otros individuos de su misma población; siempre y cuando los vectores estén presentes y las condiciones ambientales sean favorables. Además, indica que cuando los individuos tienen niveles altos de parasitemia la mortalidad por hemosporidiosis en esos individuos es más alta. Esto muestra que las áreas urbanas podrían propiciar mayor contagio y mortalidad para las aves de la región.

Prevalencia y parasitemia según la estacionalidad

Un factor que puede tener injerencia en la prevalencia y nivel de prevalencia de enfermedades transmitidas por insectos vectores es la estacionalidad. La variación anual de la temperatura y las precipitaciones pueden provocar variación estacional de la abundancia de mosquitos, esto a su vez puede afectar los patrones estacionales de incidencia de esta enfermedad (Hay et al. 2002). Sin embargo, el efecto de la temperatura y los vectores como factores explicativos de los patrones

estacionales de prevalencia de los parásitos causantes de malaria en aves ha sido poco estudiado (LaPointe et al. 2005; Okanga et al. 2013). En este estudio, los datos indican que el nivel de parasitaria es mayor durante la época seca en el lugar. La explicación para esto no es aparente ya que generalmente durante la época lluviosa la abundancia de mosquitos transmisores suele ser mayor.

Prevalencia según especie y grupo de ave

En este estudio no fue posible hacer comparaciones de prevalencia de malaria aviar entre distintas especies de aves hospedadoras debido a que se capturamos menos de diez individuos para la mayoría de especies. Sin embargo, si pudimos analizar la prevalencia para cuatro familias para las cuales capturamos más de diez individuos (Columbidae, Phasianidae, Turdidae y Tyrannidae). De estas, Columbidae y Phasianidae presentaron los valores más altos de prevalencia, pero los datos no mostraron diferencias significativas de prevalencia de malaria entre ellas. Estos datos por lo tanto refutan nuestra hipótesis de diferencia entre familias de aves, aunque se limitan solo a las familias analizadas. En el caso particular de la familia Columbidae (familias de las palomas), la prevalencia de malaria fue alta (45% de 56). Para este grupo, algunos autores concluyen que son aves muy resistentes a diversas infecciones y que puede hospedar de una gran variedad de agentes parasitarios, entre ellos los hemosporidios (Nourani et al. 2019).

Efecto de la riqueza y densidad de hospederos en la prevalencia y parasitemia de malaria aviar

La estructura y la composición de la comunidad de huéspedes también pueden afectar la dinámica de los parásitos que se encuentran en un área en particular. Varios estudios indican un efecto positivo de la riqueza (el número de especies diferentes en un área) y abundancia (número de individuos por especie) de huéspedes en la prevalencia de parásitos (Ferraguti et al. 2018). En el caso de la malaria aviar por *Plasmodium*, algunos estudios han mostrado que la prevalencia y nivel de parasitemia de este parásito aumenta con la densidad (Ortego et al. 2008) y la abundancia de huéspedes susceptibles (Robalinho Lima y Bensch 2014). Esto se debe posiblemente a que este género tiene linajes generalistas y de amplia distribución, que pueden infectar especies de aves de diferentes familias. En este estudio, no encontramos relación entre la abundancia general de aves por sitio de muestreo y el nivel de parasitemia de las aves capturadas en estas áreas. Estos datos por lo tanto no apoyan la hipótesis planteada para este estudio que señalaba influencia de este factor sobre el nivel de parasitemia en las aves del lugar.

11 Referencias

- Abella-Medrano, Carlos Antonio, Sergio Ibáñez-Bernal, Pilar Carbó-Ramírez, and Diego Santiago-Alarcon. (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):313–20.
- Alarcón, S., & Carbó, P. (2015). Parásitos sanguíneos de Malaria y Géneros Relacionados (Orden: Hemosporida) en aves de México: recomendaciones metodológicas para campo y laboratorio. *Ornitología Neotropical*, 26, 59-77.
- Arocha-López, R. 2019. "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 de 2018.” Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Atkinson, Carter T., R. J. Woods, L. Dusek, S. Sileo, and M. Iko. (1995). “Wildlife Disease and Conservation in Hawaii: Pathogenicity of Avian Malaria (*Plasmodium Relictum*) in Experimentally Infected Iiwi (*Vestiaria Coccinea*).” *Parasitology* 111(S1):S59–69
- Atkinson, C. T. (1988). Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa, Haemosporina) in Florida: potential vectors and prevalence in naturally infected *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medicine Entomology*, 25, 39–44.
- Ayadi, Tasnim, Slaheddine Selmi, Abdessalem Hammouda, Sandra Reis, Thierry Boulinier, and Claire Loiseau. 2018. “Diversity, Prevalence and Host Specificity of Avian Parasites in Southern Tunisian Oases.” *Parasitology* 145(7):971–78.
- Bahamonde-Vinueza, D. (2014). Prevalencia de malaria aviar en las aves más comunes del Parque Recreacional - Bosque Protector Jerusalén, Pichincha, Ecuador. Tesis de Grado, Pontificia Universidad Católica de Ecuador. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/11814>
- Beadell, Jon S., Farah Ishtiaq, Rita Covas, Martim Melo, Ben H. Warren, Carter T. Atkinson, Staffan Bensch, Gary R. Graves, Yadvendradev V Jhala, Mike A. Peirce, Asad R. Rahmani, Dina M. Fonseca, and Robert C. Fleischer. 2006. “Global Phylogeographic Limits of Hawaii’s Avian Malaria.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273(1604):2935–44.
- Belo, N, Rodríguez-Ferraro, A., Braga, E., Ricklefs, R. (2012). Diversity of avian haemosporidians in arid zones of northern Venezuela. *Parasitology* 139: 1021–1028.
- Belo, N, Passos, L., Martins, L., Goulart, C., Sherlock, T., et al. (2009) Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Prev Vet Med* 88: 220–4.
- Belo, N., Pinheiro, R., Reis, E., Ricklefs, R. y Braga, E. (2011). Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct cerrado habitats in Brazil. *PLoS ONE* 6, e17654.
- Bennett, G. F., Earle, R. A., Peirce, M. A., Huchzermeyer, F. W. and Squires-Parsons, D. (1991). Avian Leucocytozoidae: the leucocytozoids of the Phasianidae sensu lato. *Journal of Natural History* 25, 1407–1428.
- Bichet, C., Sorci, G., Robert, A., Julliard, R., Lendvai, A. Z., Chastel, O., ... Loiseau, C. (2014). Epidemiology of *Plasmodium relictum* infection in the house sparrow. *Journal of Parasitology*, 100, 59– 65. <https://doi.org/10.1645/12-24.1>
- Bonneaud, Camille, Irem Sepil, Borja Mila, Wolfgang Buermann, John Pollinger, Ravinder N. M. Sehgal, Gediminas Valkiūnas, Tatjana A. Iezhova, Sassan Saatchi, and Thomas B. Smith. 2009. “The Prevalence of Avian *Plasmodium* Is Higher in Undisturbed Tropical Forests of Cameroon.” *Journal of Tropical Ecology* 25(4):439–47.
- Braga, Érika Martins, Patricia Silveira, Nayara Oliveira Belo, and Gediminas Valkiūnas. 2011.

- “Recent Advances in the Study of Avian Malaria: An Overview with an Emphasis on the Distribution of Plasmodium Spp in Brazil.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 106(SUPPL. 1):3–11.
- Carlson, J., Martínez-Gómez, J., Valkiūnas, G. et al. (2013). Diversity and phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in birds of Socorro Island, México and their role in the re-introduction of the Socorro Dove (*Zenaida graysoni*). *Journal of Parasitology*, 99:270–277
- Carlson, Jenny S., Juan E. Martínez-Gómez, Anthony Cornel, Claire Loiseau, and Ravinder N. M. Sehgal. 2011. “Implications of Plasmodium Parasite Infected Mosquitoes on an Insular Avifauna: The Case of Socorro Island, México.” *Journal of Vector Ecology* 36(1):213–20.
- Clark, Nicholas J., Sonya M. Clegg, and Marcos R. Lima. 2014. “A Review of Global Diversity in Avian Haemosporidians (Plasmodium and Haemoproteus: Haemosporida): New Insights from Molecular Data.” *International Journal for Parasitology* 44(5):329–38.
- Cornet, S., and G. Sorci. 2014. “Avian Malaria Models of Disease.” *Encyclopedia of Malaria* 1–11.
- Chagas CRF, Valkiūnas G, De Oliveira Guimarães L, Monteiro EF, Guida FJV, Simões RF, et al. (2017). Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. *Malaria Journal*, 16(1):1–20.
- Dadam, D., Robinson, R., Clements, A., Peach, W., Bennett, M., Rowcliffe, M., & Cunningham, A. (2019). Avian Malaria-mediated population decline of a widespread iconic bird species. *Royal society Open Science*, 6: 182197. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.182197>.
- Díaz, Alejandra Serrato, and Lluvia Flores Rentería. 2014. “PCR : Reacción En Cadena.” Pp. 53–74 in *Herramientas moleculares aplicadas a Ecología: Aspectos teóricos y prácticos*.
- Dimitrov, D., Palinauskas, V., Iezhova, T., Bernotienė, R., Ilguñas, M., Baukauskaitė, D., Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Shapoval, P., Bolshakov, C., Markovets, M., Bensch, S., Valkiūnas, G. (2015). Plasmodium spp.: An experimental study on vertebrate host susceptibility to avian malaria. *Experimental Parasitology*, 148, 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.11.005>.
- Eisermann, K. y Avendaño, C. (2018). An update on the inventory, distribution and residency status of bird species in Guatemala. *Bulletin British Ornithologists' Club*, 138: 148-229.
- Evans, K.L., Gaston, K.J., Sharp, S.P., McGowan, A., Simeoni, M. & Hatchwell, B.J. (2009). Effects of urbanization on disease prevalence and age structure in blackbird Turdus merula populations. *Oikos* 118: 774–782.
- Fallon, S., Ricklefs, R. E., Latta, S. and Bermingham, E. (2004). Temporal stability of insular avian malarial parasite communities. *Proceedings of the Royal Society of London*, B 271, 493–500.

- Fecchio, A., Chagas, C., Bell, J., & Kirchgatter, K. (2020). Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta Tropical*, 204, 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105364>.
- Ferraguti, Martina, Josué Martínez-de la Puente, Staffan Bensch, David Roiz, Santiago Ruiz, Duarte S. Viana, Ramón C. Soriguer, and Jordi Figuerola. 2018. "Ecological Determinants of Avian Malaria Infections: An Integrative Analysis at Landscape, Mosquito and Vertebrate Community Levels." *Journal of Animal Ecology* 87(3):727–40.
- Forrester D, Greiner E (2008) Leucocytozoonosis. In: Atkinson C, Thomas NB (eds) Parasitic diseases of wild birds. *Wiley-Blackwell, Ames*, 54–107.
- Gálvez-Zagaceta P. A., Vela-Trigoso, Estela-Moreno T., Hicler S. N. Rodríguez-Mashacur, Castro-Gómez, Cobos-Ruiz J., Paredes-Rodríguez M., y Dylan-Maddox, J. (2021). Prevalencia de malaria en aves de sotobosque en la cuenca alta del río Itaya, Loreto, Perú. *Revista ECIPerú*, 18:1, 32-37. <https://doi.org/10.33017/RevECIPeru2021.0004/>
- Greene, Terry, and Murray Efford. 2012. "Birds: Estimates of Absolute Density and Abundance - Distance Sampling." *Inventory and Monitoring Toolbox: Birds* 1.0:1–28.
- Greiner, E., Bennett, G., White, E. y Coombs, R. (1975). Distribution of the avian hematozoa of North America. *Canadian Journal of Zoology*, 53:1762–1787.
- González, Angie D., Nubia E. Matta, Vincenzo A. Ellis, Eliot T. Miller, Robert E. Ricklefs, and H. Rafael Gutiérrez. 2014. "Mixed Species Flock, Nest Height, and Elevation Partially Explain Avian Haemoparasite Prevalence in Colombia." *PLoS ONE* 9(6).
- Gutiérrez-López, R. Martínez-de la Puente, J. (2020). Factores de relevancia en la dinámica de transmisión de malaria aviar: patrones de alimentación de los mosquitos y capacidad de desarrollo de Plasmodium spp. *Ecosistemas* 29 (2): 1964. <https://doi.org/10.7818/ECOS>.
- Hatchwell, B. J., Wood, M. J., Anwar, M. and Perrins, C. M. (2000). The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula*. *Canadian Journal of Zoology*, 78, 684–687.
- Hay, S. I. , Cox, J. , Rogers, D. J. , Randolph, S. E. , Stern, D. I. , Shanks, G. D. , ... Snow, R. W. (2002). Climate change and the resurgence of malaria in the East African highlands. *Nature*, 415, 905–909.
- Hernández-Lara, C. Fernando González-García, & Diego Santiago-Alarcon. (2017). "Spatial and Seasonal Variation of Avian Malaria Infections in Five Different Land Use Types within a Neotropical Montane Forest Matrix." *Landscape and Urban Planning* 157:151–60.
- Hernández-Lara, C., Carbó-Ramírez, P., & Diego Santiago-Alarcon, D. (2020). Effects of land use change (rural-urban) on the diversity and epizootiological parameters of avian Haemosporida in a widespread neotropical bird. *Acta Tropica*, 209. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105542>.

- Hellgren, Q., J. Waldenstrom, & S. Bensch. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*, 90:797-802
- Holmstad PR, Jensen KH, Skorping A. (2006). Vector-borne parasites decrease host mobility: A field test of freeze or flee behaviour of willow ptarmigan. *International Journal of Parasitology*, 36: 735–740. 10.1016/j.ijpara.2006.02.015 }
- Ibrahim, R., & Al-Rudaie, H. (2020). Molecular Detection of Avian Malaria (*Plasmodium gallinaceum*) in loval domestivated breed chickens (*Gallus gallus domesticus*) in Baghdad. *The Iraqui Journal of Veterinary Medicine*, 44(E0), 75-79. DOI: [https://doi.org/10.30539/ijvm.v44i\(E0\).1025](https://doi.org/10.30539/ijvm.v44i(E0).1025).
- Instituto Nacional de Estadística Guatemala. (2019). Principales resultados Censo 2018. Guatemala, Guatemala.
- Ishtiaq, F., Rao, M., Hung, X., & Bensch, S. (2017). Estimating prevalence of avian haemosporidians in natural populations: a comparative study on screening protocols. *Parasites & Vectors*, 10:127, 1-10. DOI: 0.1186/s13071-017-2066-z.
- Jiménez-Peñuela, J., Ferraguti, M., Martínez-de la Puente, J., Soriguer, r. & Figuerola, j. (2021). Urbanization effects on temporal variations of avian haemosporidian infections, *Environmental Research*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111234>.
- Karamba, K. (2012). Occurrence of *Plasmodium gallenaecium* Parasites in Chickens (*Gallus gallus*) in Kano State, Nigeria. *Nigerian Journal of Parasitology*, 33(1).
- LaPointe, D. A. , & M.L. Goff, C. T. Atkinson. (2005). Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum* . *Journal of Parasitology*, 91, 843–849.
- Lacorte GA, Fe'lix GMF, Pinheiro RRB, Chaves AV, Almeida-Neto G, et al. (2013). Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites – A Molecular Survey from Southeast Brazil. *PLoS ONE* 8(3): e57770. doi:10.1371/journal.pone.0057770
- Lefèvre T, Roche B, Poulin R, Hurd H, Renaud F, Thomas, F. (2008). Exploiting host compensatory responses: the 'must' of manipulation? *Trends in Parasitology*, 24: 435-439.
- Lutz HL, Hochachka WM, Engel JI, Bell JA, Tkach VV, Bates JM, et al. (2015) Parasite Prevalence Corresponds to Host Life History in a Diverse Assemblage of Afrotropical Birds and *Haemosporidian Parasites*. *PLoS ONE*, 10(4): e0121254. doi:10.1371/journal.pone.0121254
- Marroquín-Flores, RA, Williamson, JL, Chávez AN, Bauernfeind SM, Baumann MJ, Gadek CR, Johnson AB, McCullough JM, Witt CC, Barrow LN. (2017). Diversity, abundance, and host

- relationships of avian malaria and related haemosporidians in New Mexico pine forests. *PeerJ* 5:e3700 <https://doi.org/10.7717/peerj.3700>
- Martínez-De la Puente, J., Ferraguti, M. (2020). Ecología de Transmisión de Enfermedades: Interacciones Entre Aves, Parásitos Sanguíneos y Vectores. *Ecosistemas Revista Científica De Ecología y Medio Ambiente* 29(2): 2039. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2020.29-2>
- Merino, S., Moreno, J., Sanz, J. J. and Arriero, E. (2000). Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society B*, 267: 2507-2510.
- Merino, S., Moreno, J., Vásquez, R.A., Martínez, J., Sánchez-Monsálvez, I., Estados, C.F., et al. (2008). Haematozoa in forest birds from southern Chile: Latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. *Austral Ecology*, 33:329-340.
- Moens, M., & Perez-Tris, J. (2016). Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. *International Journal for Parasitology*, 46, 41– 49.
- Mukhin, A., Palinauskas, V., Platonova, E., Kobylkov, D., Vakoliuk, I., & Valkiūnas, G. (2016). The Strategy to Survive Primary Malaria Infection: An Experimental Study on Behavioural Changes in Parasitized Birds. *PloS one*, 11(7), e0159216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159216>
- Nájera-Acevedo, A. 2006. *The Conservation of Thorn Scrub and Dry Forest Habitat in the Motagua Valley, Guatemala: Promoting the Protection of a Unique Ecoregion 1*.
- Nourani, L., Dinparast, Djadid, N. (2019). Molecular Identification of Avian Malaria in Wild Birds from Iran, 2nd International Congress of Climate Change & Vector Borne Diseases and 4th National Congress of Medical Entomology.
- Ochoa-López, R. (2019). Determinación de la presencia hemoprotozoarios, a través del método de frote sanguíneo en gallinas de traspatio y reproductoras de granja en el municipio de Sanarte, departamento de El Progreso, en el período de abril a julio de 2018. Tesis de grado. Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Okanga, S. , Cumming, G. S. , & Hockey, P. A. R. (2013). Avian malaria prevalence and mosquito abundance in the western Cape, South Africa. *Malaria Journal*, 12, 370.
- Oakgrove KS, Harrigan RJ, Loiseau C, Guers S, Seppi B, Sehgal RNM. (2014). Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. *International Journal for Parasitology* 44:717–727 DOI [10.1016/j.ijpara.2014.04.011](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.04.011)
- Organización Mundial de Sanidad Animal -OIE-. (2008). Obtenido de Oie_Códigos y Manuales. Manual Para Toma y Remisión de Muestras.: <https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/>

- Orozoco-Jauregui, Plinio Andres. 2014. “Determinación de La Presencia de Malaria En Aves Del Zoológico Nacional La Aurora.” Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ortego, Joaquín, Pedro J. Cordero, José Miguel Aparicio, and Gustau Calabuig. 2008. “Consequences of Chronic Infections with Three Different Avian Malaria Lineages on Reproductive Performance of Lesser Kestrels (*Falco Naumanni*).” *Journal of Ornithology* 149(3):337–43.
- Palinauskas, Vaidas, Gediminas Valkiunas, Asta Križanauskiene, Staffan Bensch, and Casimir V. Bolshakov. 2009. “*Plasmodium Relictum* (Lineage P-SGS1): Further Observation of Effects on Experimentally Infected Passeriform Birds, with Remarks on Treatment with Malarone.” *Experimental Parasitology* 123(2):134–39.
- Quevedo-Salazar, C. 2012. Diagnostico de paludismo aviar en pollo (*Gallus Gallus*) a través de la técnica de PCR convencional en el municipio de La Gomera, Departamento de Escuintla, Guatemala. Tesis de grado. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- R Development Core Team. (2012). R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.0.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0.
- Rhim H, Bae J, Kim H, Han JI. (2018). Prevalence and phylogenetic analysis of avian haemosporidia in wild birds in the republic of Korea. *Journal of Wildlife Diseases*, 54(4):772–81.
- Rivero, Ana, and Sylvain Gandon. 2018a. “Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present.” *Trends in Parasitology* 34(8):712–26.
- Robalinho Lima, Marcos, and Staffan Bensch. 2014. “Why Some Parasites Are Widespread and Abundant While Others Are Local and Rare?” *Molecular Ecology* 23(13):3130–32.
- Rodríguez, O. y Matta, N. (2001). Blood parasites in some birds from eastern plains of Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 1173–1176.
- Santiago-Alarcon D, Carbó-Ramírez P, MacGregor-Fors I, Chávez-Zichinelli C.A., Yeh P.J. (2020). Avian malaria prevalence of an invasive urban bird is lower in urban than non-urban environments. *Ibis*, 162: 201-214. doi:10.1111/ibi.12699.
- Santiago-Alarcón, D., Palinauskas, V., y 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>
- Santiago-Alarcon, D., Outlaw, D., Ricklefs, R. y Parker, P. (2010). Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in New World Columbiformes, with emphasis on the endemic Galapagos dove. *International Journal for Parasitology* 40, 463–470.
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V. y Schaefer, H. (2012), Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological*

- Reviews, 87: 928-964. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x>
- Santiago-Alarcón, D. y Carbó-Ramírez. (2015). Parásitos sanguíneos de malaria y géneros relacionados (Orden: Haemosporida) en aves de México: recomendaciones Metodológicas para Campo y Laboratorio. *Ornitología Neotropical* 26:59-77.
- Santiago-Alarcón, D., MacGregor-Fors, I., Falfán, I., Lüdtke, B., Segelbacher, G., Schaefer, M., & Renner, S. (2019). "Parasites in Space and Time: A Case Study of Haemosporidian Spatiotemporal Prevalence in Urban Birds." *International Journal for Parasitology* 49(3–4):235–46.
- Santiago-Alarcon y Marzal, A. (2020). Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics. Ecology, evolution and Systematics. Springer. ISBN: 978-3-030-51632-1
- Santos-Prezoto HH, D'Agosto M, Daemom, E. (2004). Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do Plasmodium (Novyella) juxtannucleare em Gallus gallus sob condições naturais, no período de um ano. *Parasitologia Latinoamericana*, 59: 14-20.
- Sibley, David, Chris. Elphick, John B. (John Barnard) Dunning, and National Audubon Society. 2001. *The Sibley Guide to Bird Life & Behavior*. Alfred A. Knopf.
- Sousa, O. E., and C. M. Herman. 1982. "Blood Parasites of Birds from Chiriqui and Panama Provinces in the Republic of Panama." *Journal of Wildlife Diseases* 18(2):205–21.
- Souza, Paulo, Carina Elisei, Cleber Soares, and Carlos Massard. 2000. "Criopreservación de Plasmodium (Novyella) Juxtannucleare Con Glicerol." *Parasitología Al Día* 24(1–2):22–26.
- Tella, J. L., Blanco, G., Forero, M. G., Gajon, A., Donazar, J. A. and Hiraldo, F. 1999. Habitat, world geographic range, and embryonic development of hosts explain the prevalence of avian hematozoa at small spatial and phylogenetic scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 96: 1785-1789.
- Tinajero, R., Chapa-Vargas, L., Ham-Deñás, J.G. et al. (2019). Haemosporidian infection of the American Kestrel in the southern Chihuahua Desert, Mexico: relationship with land use. *Journal of Ornithology* 160, 699–710. <https://doi.org/10.1007/s10336-019-01640-3>
- Universidad Rafael Landívar (Guatemala). Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente IARNA/URL. (2008). Riqueza de especies de aves en Guatemala y estado de su conocimiento Guatemala: Universidad Rafael Landívar/Instituto de Agricultura, Recursos naturales y Ambiente Documento 21, Serie técnica 21iv + 26p
- Valera, F., Carrillo, C. M., Barbosa, A. and Moreno, E. (2003). Low prevalence of haematozoa in trumpeter finches Bucanetes githagineus from southeastern Spain: additional support for a restricted distribution of blood parasites in arid lands. *Journal of Arid Enviroments*, 55: 209-213.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T., Brooks, D., Hanelt, B., Brant, S., Sutherlin, M., Causey, D. (2004). Additional Observations on Blood Parasites of Birds in Costa Rica. *Journal of Wildlife*

- Diseases*, 40 (3): 555–561. DOI <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.3.555>
- Valkiūnas, Gediminas. (2005). *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Vol. 43. Florida: CRC Press.
- Valkiūnas, Gediminas, Tatjana A. Iezhova, Daniel R. Brooks, Ben Hanelt, Sara V. Brant, Marie E. Sutherlin, and Douglas Causey. (2004). “Additional Observations on Blood Parasites of Birds in Costa Rica.” *Journal of Wildlife Diseases* 40(3):555–61.
- Valkiūnas, G., Palinauskas, V., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D. Dimitrov, D. Bernotienė, R., Zehtindjiev, P., Ilieva, M., & Iezhova, T.A. (2014). Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. *Parasitology Research*, 113, 2251-2263.
- Valkiūnas, G., Kazlauskienė, R., Bernotienė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T.A. 2013. Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitology Research*, 112, 2159-2169.
- Walther E., Carlson J, Cornel, A., Morris B., Sehgal, R. (2016). First molecular study of prevalence and diversity of avian Haemosporidia in a central California songbird community. *Journal of Ornithology*, 157:549–564. doi: 10.1007/s10336-015-1301-7.
- Wahl, Marian. 2013. “Blood-Borne Parasites in the Black Vulture *Coragyps Atratus* in Northwestern Costa Rica.” *Vulture News* (July):22–31.
- Weatherhead, P. J. and Bennett, G. F. (1992). Ecology of parasitism of brown headed cowbirds by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology*, 70, 1–7.
- Wood, M., Cosgrove, T., Wilkin, S. Knowles, K. y Sheldon, B. (2007). Within population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology*, 16, 3263-3273
- Winchell, E. (1978). Hematozoa of some birds of El Salvador. *Journal of Parasitology*, 64, 558–559
- Young, Bruce E., Mary C. Garvin, and David B. McDonald. 1993. “IN BIRDS Other.” *Journal of Wildlife Diseases* 29(4):555–60.
- Yorinks, N. y Atkinson, C. (2000). Effects of malaria on activity budgets of experimentally infected juvenile *Apapane* (*Himatione sanguinea*). *Auk*, 117: 731-738.

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

12 Apéndices

Apéndice 1. Nombre de la localidad, coordenadas de ubicación y descripción del tipo de área (urbana, semiurbana o rural) que se visitaron durante los muestreos en campo del presente proyecto.

N	Municipio	Nombre del sitio	Coordenadas geográficas		Tipo de hábitat
			N	W	
1	Cabañas	Parque Regional Municipal Niño Dormido	N14.90542°	W-089.81735°	rural
2	Cabañas	Reserva Natural Privada Heloderma	N14.86298°	W-089.78248°	rural
3	Estanzuela	El Guayabal	N15.00401°	W-089.63223°	rural
4	Estanzuela	Finca Emerio Portillo	N15.01711°	W-089.60807	rural
5	Estanzuela	Terrenos agrícolas del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas -ICTA-	N14.96043°	W-089.58813°	Urbano
6	Rio Hondo	Parque Regional Municipal El Castillo	N15.04235°	W-089.60950°	rural
7	San Jorge	Sinaneca	N14.88060°	W-089.57786	rural
8	Zacapa	Barrio La Reforma	N14.97087°	W-089.53638°	Urbano
9	Zacapa	El Terrero	N15.00072°	W-089.49904°	Urbano
10	Zacapa	Finca Carlos Vargas	N14.99425°	W-089.54660°	Urbano
11	Zacapa	Finca Brían López	N14.97830°	W-089.51612°	rural
12	Zacapa	Finca Adrián Salguero y familia	N14.95724°	W-089.56281°	Urbano
13	Zacapa	Hacienda Don José, Colonia el Valle, Zacapa	N14.97717°	W-089.54603°	Urbano
14	San Juan	Finca Jairo Trabanino	N14.93226°	W-089.62605°	rural
15	San Pablo	San Pablo	N15.02950°	W-089.52666°	rural

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 2. Licencia de colecta emitida por el CONAP para la colecta de especímenes de este estudio y dictamen de aprobación del protocolo de extracción de muestras sanguíneas y de sacrificio de las aves muestreadas.

CONSEJO NACIONAL DE ÁREAS PROTEGIDAS (CONAP)
GUATEMALA, C.A.

Serie A N° 004016

LICENCIA DE COLECTA O APROVECHAMIENTO DE VIDA SILVESTRE

MICHELLE BUSTAMANTE CASTILLO

1. Nombre o razón social: _____
Dirección: _____
Teléfono: _____ Identificación: _____

2. Tipo de colecta: comercial _____ científica XXX aficionada _____

3. No. de registro: _____

4. Especies a coleccionar:

ESPECIES	CANTIDAD	FORMA
Coliiformes - Pinos y Salinas	50	20 individuos vivos y 30 muertos
Coliiformes - Palmar	10	10 individuos y 0 muertos
Caprimulgiformes - Colinas, venecias, bocanillos	10	10 individuos y 0 muertos
Passeriformes - bosques y áreas protegidas	10	10 individuos y 0 muertos
Passeriformes - bosques, áreas protegidas, zonas rurales, áreas de cultivo	10	10 individuos vivos y 0 muertos

5. Ubicación de la colecta o aprovechamiento: _____

6. Número de registro de la propiedad: _____

7. Técnicas de colecta autorizadas: _____

8. Nombre de colector(es) autorizado(s) e identificación: _____

9. Localidad de traspaso de material colectado: _____

10. Lugar y fecha de emisión: _____

Válido hasta: _____

Delegado CONAP



Guatemala, 6 de julio de 2020
Ref. EEP.88.2020

Doctora
Michelle Bustamante Castillo
Investigadora
Instituto de Investigación, Centro Universitario de Zacapa
Universidad de San Carlos de Guatemala

Respetable doctora Bustamante:

En nombre del Comité de Bioética de Postgrado de la Universidad de San Carlos de Guatemala me permito informarles que el Sub comité *Ad Hoc* nombrado para conocer sobre el protocolo de investigación titulado "Epidemiología de malaria aviar en una región de bosque seco de Guatemala", ha dictaminado APROBADO en relación a aspectos éticos de los métodos y procedimientos propuestos para la investigación.

Para uso de su interés, se extiende el presente documento.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Maestra Ligia Vanessa Ríos de León
Coordinadora Comité Bioética de Postgrado
Universidad de San Carlos de Guatemala

cc. archivo
lvrdj

Apéndice 3. Secuencias y tamaños de amplificación de los cebadores diseñados para realizar el PCR Multiplex propuesto por Ciloglu et al. 2019.

	Parasite genus	Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)
Multiplex PCR primers	<i>Plasmodium</i>	PMF	CCTCACGAGTCGATCAGG	377–379
		PMR	GGAAACCGGCGCTAC	
	<i>Haemoproteus</i>	HMF	ATTGGATGTCAATTACCACAATC	525–533
		HMR	GGGAAGTTTATCCAGGAAGTT	
	<i>Leucocytozoon</i>	LMF	TGGAACAATAATTGSATTATTTACAYT	218
		LMR	AACATATCATATTCCATCCATTTAGATTA	
qPCR primers	<i>Plasmodium</i>	PQF	CATGGATTTGTGGTGGATATCTTG	198
		PQR	TATCRAGACTTAAWAGATTGGATAGAAG	
	<i>Haemoproteus</i>	HQF	GGATTTGTGGWGGATATAYTATWAGTGAT	194
		HQR	ATCTARACATAATAGACTTGGATARAAA	
	<i>Leucocytozoon</i>	LQF	GGWCAAATGAGTTTGTGGGA	212
		LQR	CCTAAAGGATTAGTGCTACCWTGAAT	

Tomado de: Ciloglu et al. 2019.

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 4. Fotografías de colocación de redes de niebla para captura de aves silvestres en los sitios de muestreo.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Apéndice 5. Fotografías que muestran el trabajo de extracción de las aves capturadas en las redes de niebla.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 6. Fotografías que muestran el trabajo de extracción de las aves de corral muestreadas en el presente trabajo.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 7. Fotografías de algunas de las especies de aves capturadas durante los muestreos en campo.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

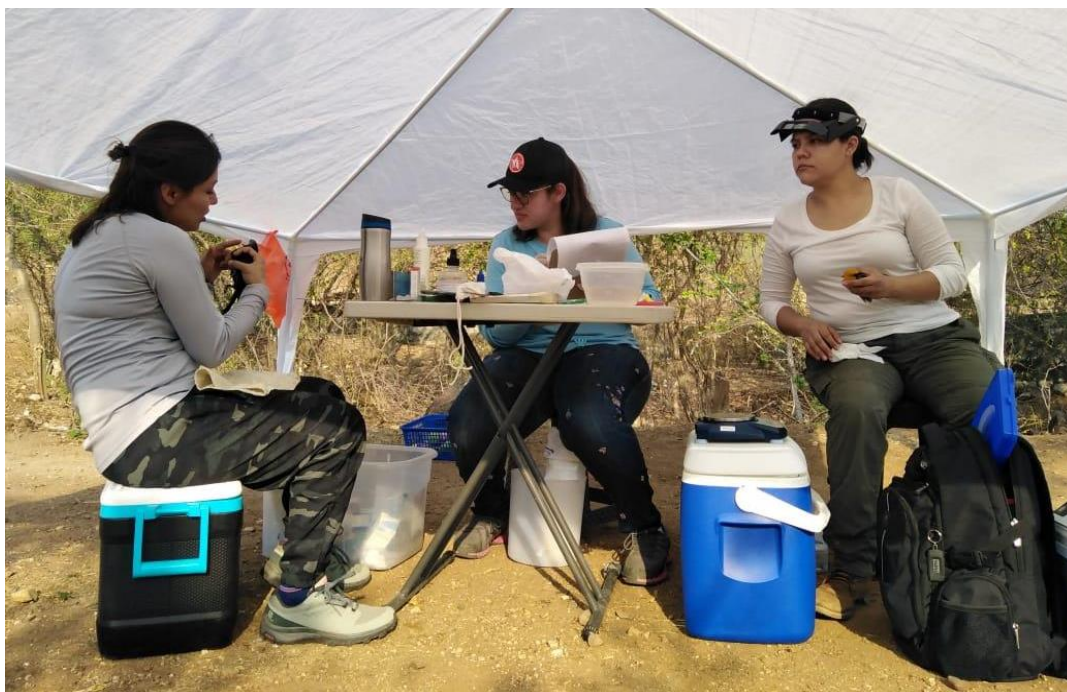
Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 8. Fotografías que muestran el trabajo de toma de peso y datos morfológicos (e.g. peso, largo de alas y cola, largo de pico, entre otros) de las aves muestreadas.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 9. Colecta de muestras sanguíneas y elaboración de frotos sanguíneos en campo de las aves muestreadas en los sitios de estudio.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021
Dirección General de Investigación –DIGI–

Dirección General de Investigación –DIGI–



Apéndice 10. Colecta de datos de riqueza y abundancias de aves empleando el método puntos de conteo en los sitios de estudio.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 11. Fotografías de trabajo de laboratorio. Se observa parte del proceso de tinción de láminas con frotos sanguíneos y análisis al microscopio de las láminas ya teñidas.



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

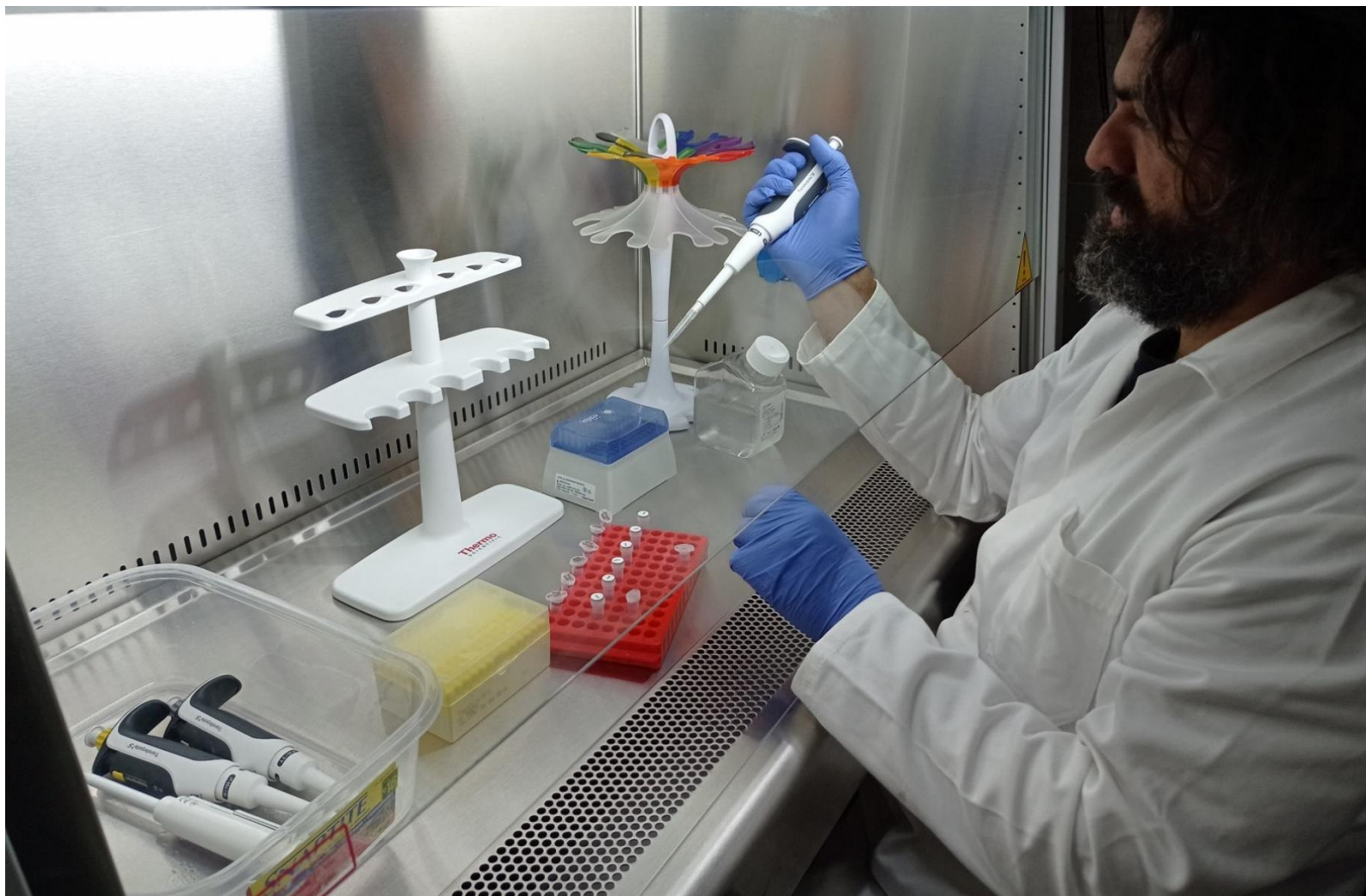
Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

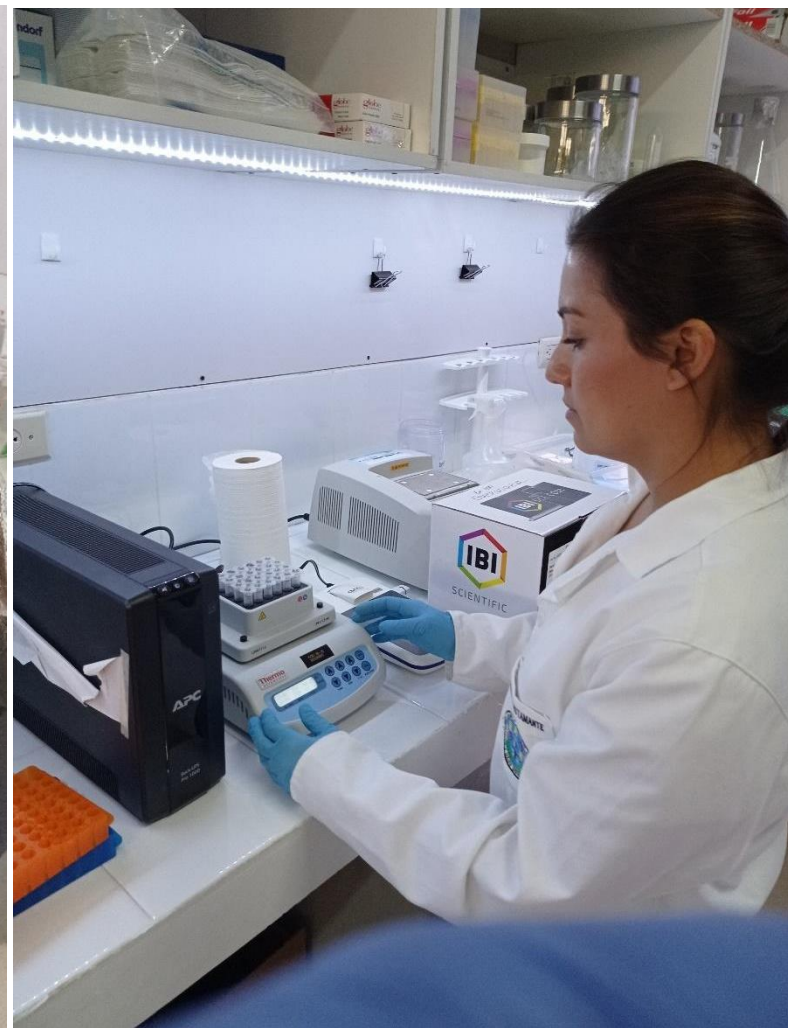
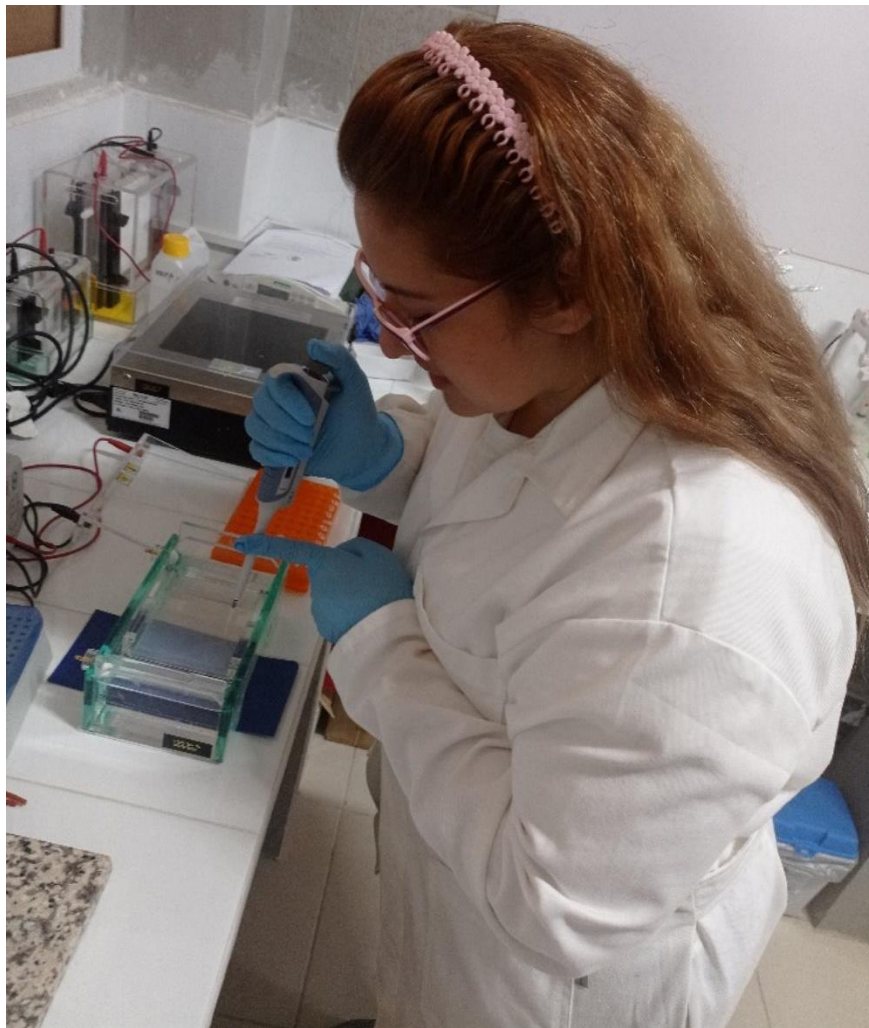
Dirección General de Investigación –DIGI–

Apéndice 12. Fotografías del trabajo de extracción de ADN y realización de análisis de PCR para la detección de parásitos sanguíneos causantes de malaria aviar en las muestras de sangre de especies de aves colectadas en el estudio.



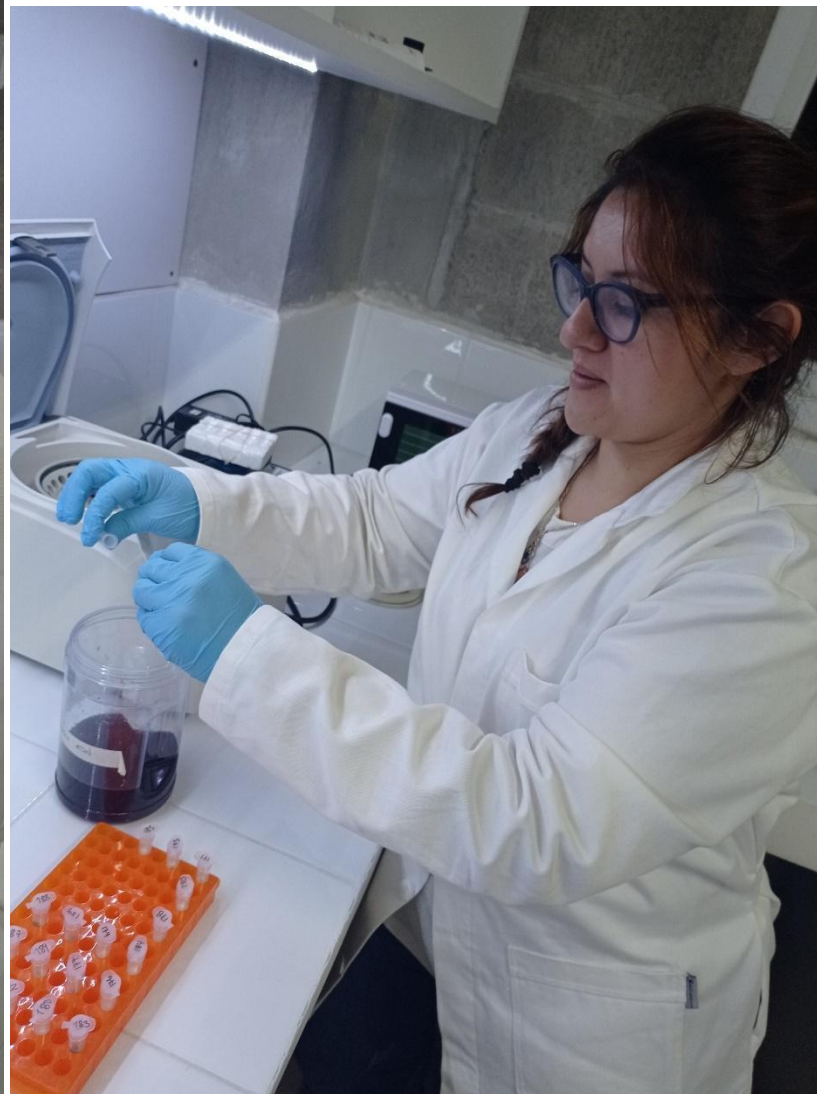
Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



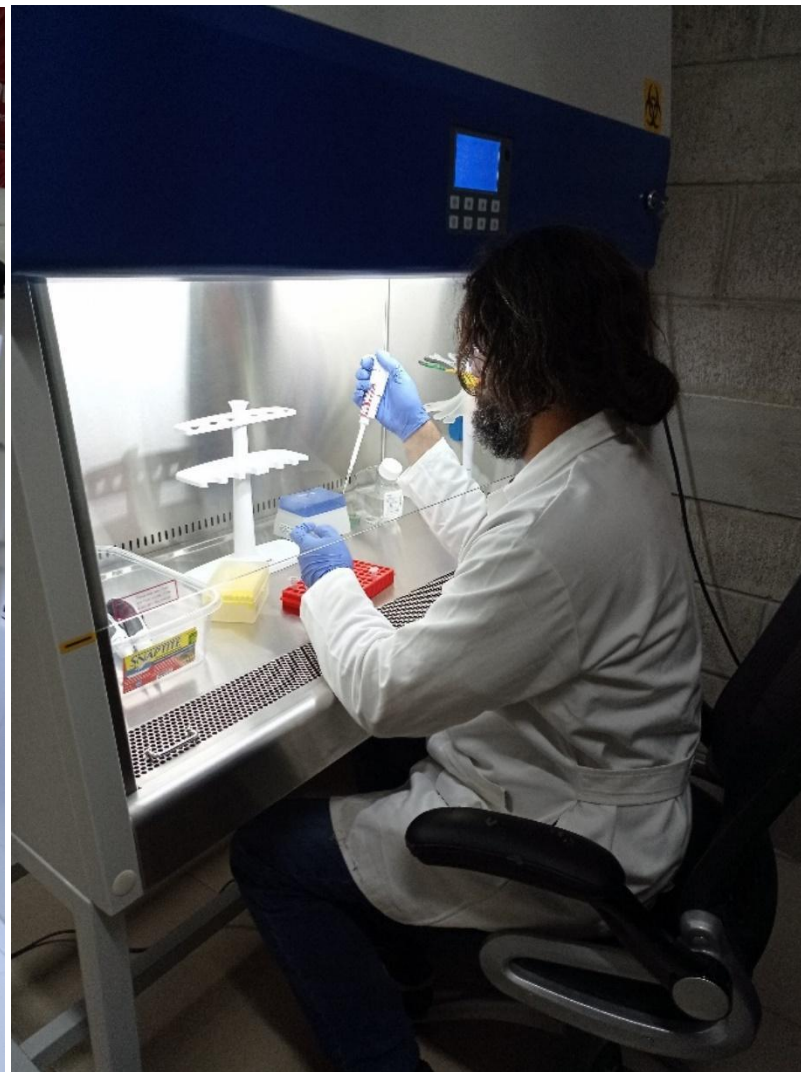
Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



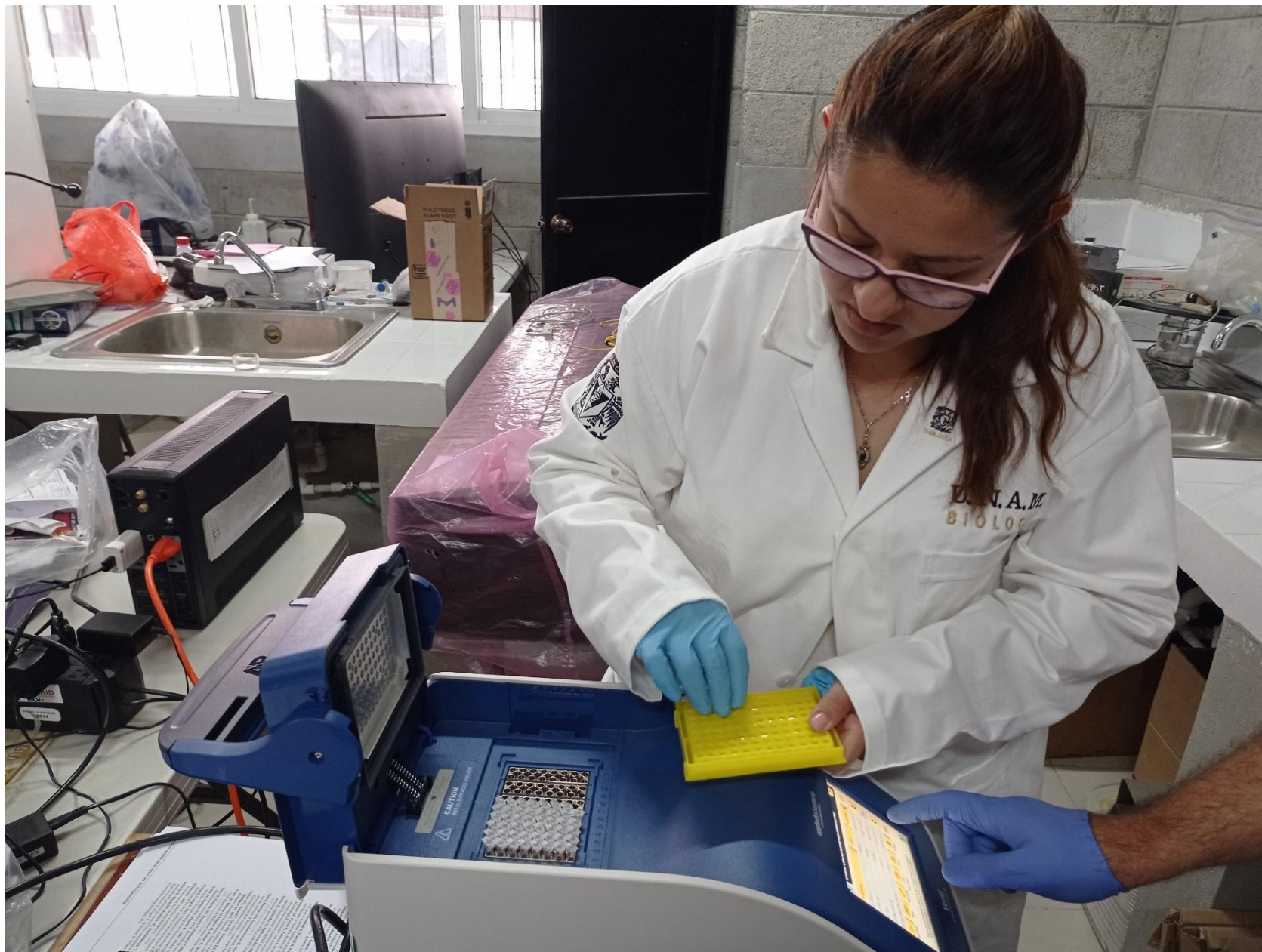
Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



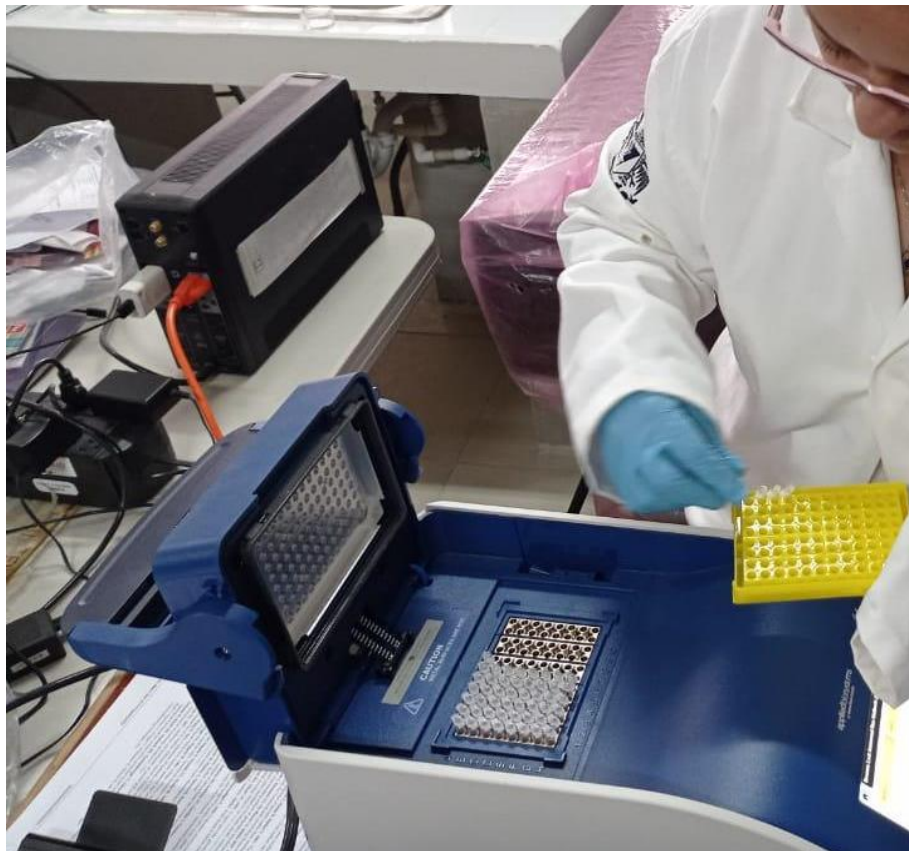
Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–



Informe final proyecto de investigación 2021

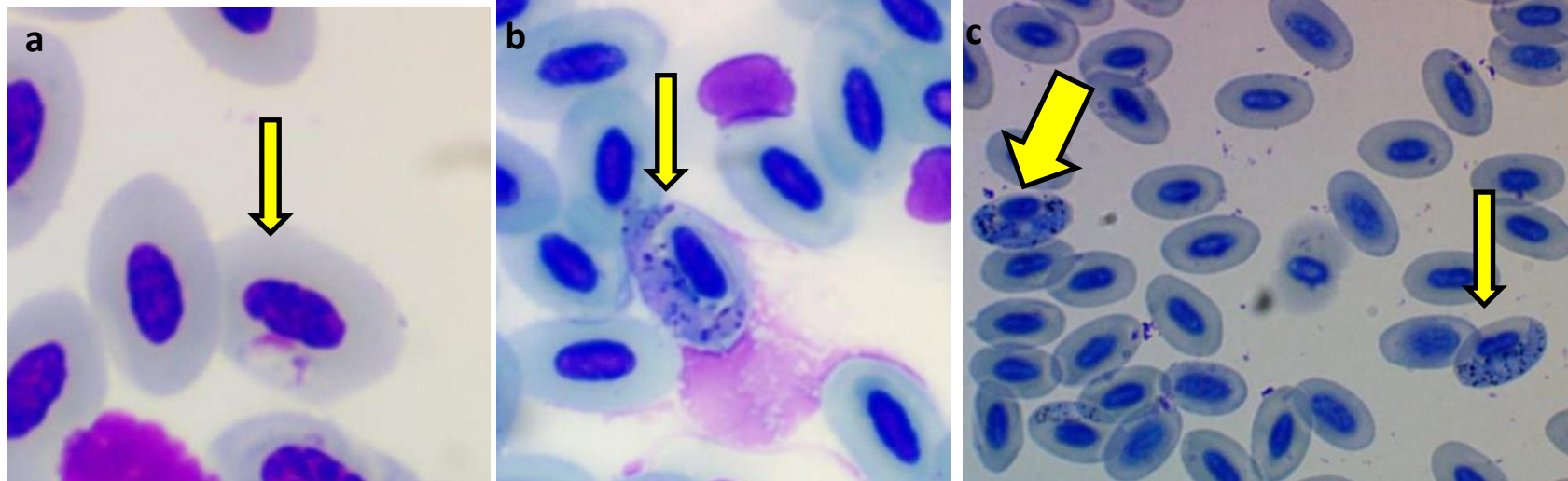
Dirección General de Investigación –DIGI–

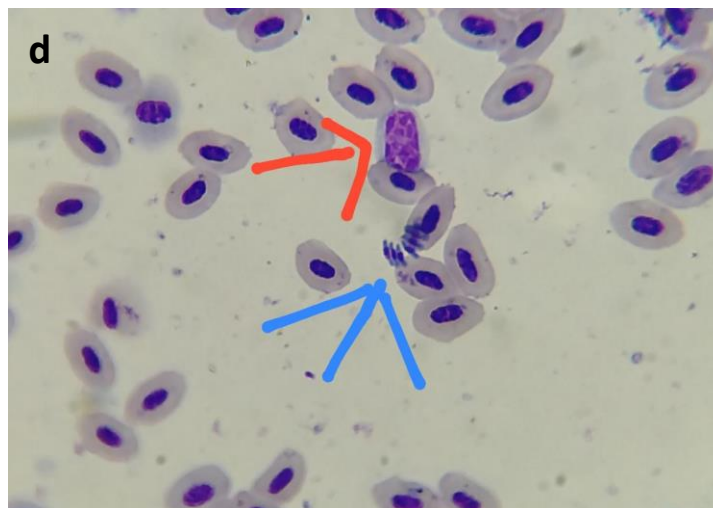


Informe final proyecto de investigación 2021

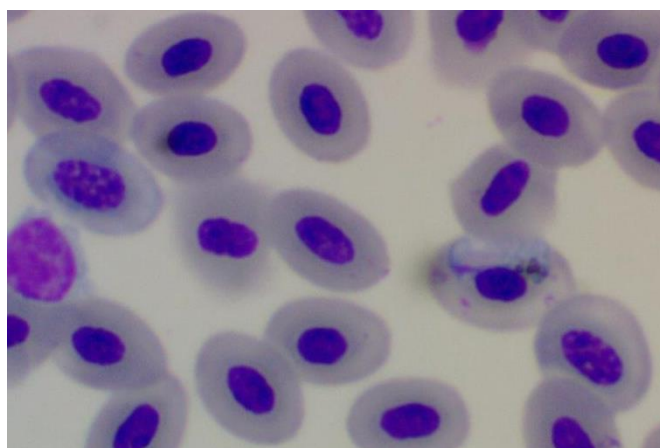
Dirección General de Investigación –DIGI–

Apendice 13. Láminas positivas, descripción morfológica de género y etapa parasitaria. **a.** merozoito intraeritrocitario de *Plasmodium sp.* en *Icterus gularis*. **b.** Macromegatocito de *Plasmodium sp.* en *Columbina inca*. **c.** Parasitemia por *Haemoproteus sp.* en *Columbina inca*, con nivel alto de parasitemia, se observan macromegatocito (1) y un micromegatocito (2) en esta muestra. **d.** Se señala con flecha celeste Ookinetos libres de *Plasmodium sp.* en *Myarchus tuberculifer*, la flecha roja, señala una célula blanca.

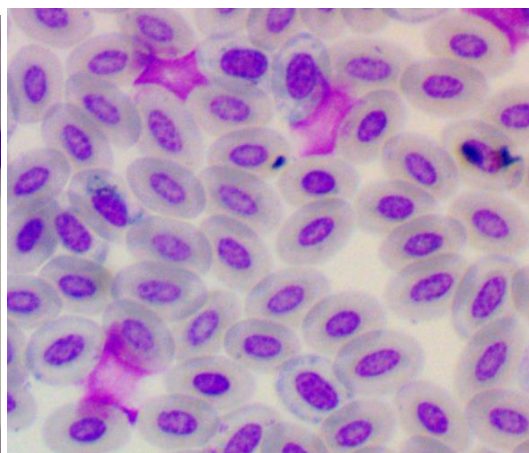




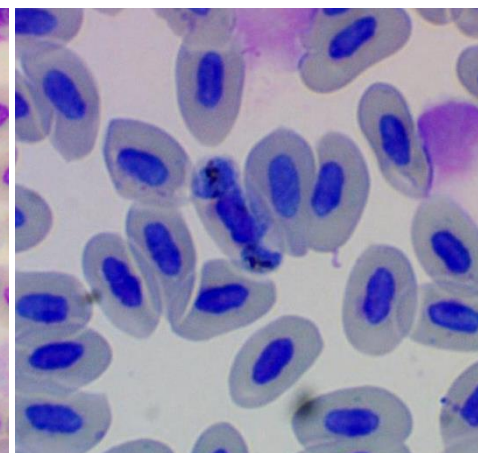
Apéndice 14. Láminas positivas para malaria aviar de algunas de las especies muestreadas en el estudio. Los nombres de las especies a las que corresponde el frote sanguíneo se enlistan en la parte inferior de cada foto.



Pheucticus crysopeplus



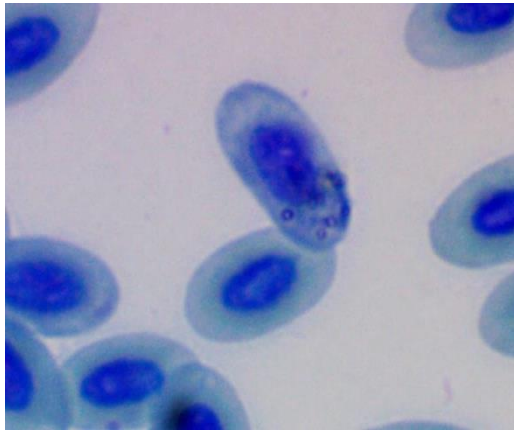
Icterus pustulatus



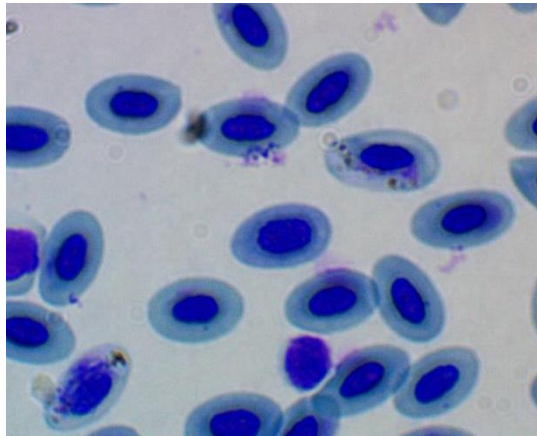
Peucaea ruficauda

Informe final proyecto de investigación 2021

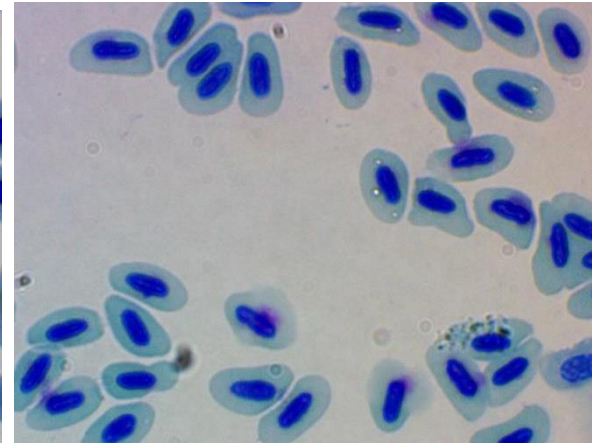
Dirección General de Investigación –DIGI–



Calumbina livia



Mimus gilvus



Amazilia rutila

13. Aspectos éticos y legales

La presente investigación se registró en el CONAP con el número 00417-B y se obtuvo el permiso de colecta No. 004016 (ver apéndice 2). Además, se obtuvo el visto bueno del comité de Bioética del Posgrado de la FMVZ de la USAC para el protocolo de extracción de muestras sanguíneas y protocolo de sacrificio para las aves que fueron sacrificadas (ver apéndice 2).

14. Vinculación

Este proyecto se vinculó a tres instituciones con enfoque de investigación de enfermedades zoonóticas y dinámica parásito-hospedero (CUNZAC, FMVZ y INECOL). El proyecto implicó un componente de transferencia de conocimientos entre los investigadores de este proyecto y el laboratorio del Dr. Alarcón quien orientó acerca de los métodos y técnicas que debíamos emplear para trabajar con parásitos sanguíneos del grupo Apicomplexa. Ocurrió además un intercambio de conocimientos entre investigadores del FMVZ sobre técnicas de identificación de estos parásitos mediante el análisis de frotis sanguíneos. Además, el IICUNZAC capacitó a las dos investigadoras de este proyecto en técnicas moleculares de extracción de ADN y técnica para la identificación de parásitos causantes de malaria aviar empleando PCR multiplex. Finalmente, el proyecto se vinculó al departamento de salud del MARN quienes apoyaron en coordinar las visitas de campo a distintas aldeas y caseríos de la región para que fuera posible la toma de muestras sanguíneas de aves de corral o traspatio.

15. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Se envió un resumen técnico de los hallazgos de este proyecto a la oficina de oriente del MSPAS, MARN y CONAP. Se realizó una presentación en línea de los resultados a representantes de esta institución para que conocieran los resultados más importantes de este estudio. Los resultados serán publicados además en dos artículos científicos que están en preparación. Además, los resultados se presentaron en un seminario web del IICUNZAC sobre resultados de investigación de proyectos ejecutados durante 2021. Finalmente, se elaboró un poster científico para divulgar en redes sociales los resultados de este proyecto. Este poster se posteará en las redes sociales del IICUNZAC.

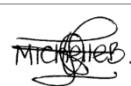
16. Aporte de la propuesta de investigación a los ODS

La presente investigación contribuyó con el cumplimiento del Objetivo 3 Salud y Bienestar. Este objetivo indica que la buena salud es esencial para el desarrollo sostenible. Toma en cuenta la ampliación de las desigualdades económicas y sociales, la rápida urbanización, las amenazas para el clima y el medio ambiente, y los nuevos problemas de salud, como las enfermedades no transmisibles. En este proyecto se generaron datos sobre epidemiología de malaria empleando a las aves como un modelo para entender el efecto de la urbanización y la estacionalidad en la prevalencia de esta enfermedad en poblaciones silvestres y de crianza. Estos datos, sientan las bases para el estudio integral de esta enfermedad en el oriente del país, que ataca a animales y humanos.

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI–

17. Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Michelle Bustamante Castillo	Titular I	20060145	Si	

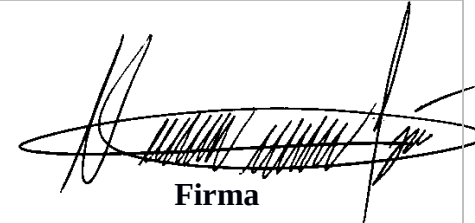
Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación

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.

Michelle Bustamante Castillo Nombre del coordinador del proyecto de investigación	 Firma
Fecha: 28/02/2022	

Aval del director(a) 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 Izás Coordinar, Instituto de Investigaciones, CUNZAC, USAC	 Firma
---	--

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

Fecha: 28/02/2022

18. Visado de la Dirección General de Investigación

Vo.Bo. Dra. Hilda E. Valencia de Abril Coordinadora Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud -PUIIS-	 Firma
Fecha: 28/02/2022	

Vo.Bo. Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar Coordinador General de Programas de investigación	Firma
Fecha: 28/02/2022	