



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA
MENCIÓN**



**PREVALENCIA DE PARÁSITOS MALARICOS Y OTROS
HAEMOSPORIDIOS EN AVES EN LA ESTACIÓN DEL PLANETARIO
SIMÓN BOLÍVAR MARACAIBO ESTADO ZULIA**

Cursante Postgrado: Licda. Glennys Praderes

Tutor: M.V. MSc. José A. Romero P.

Maracay, Febrero 2016

**PREVALENCIA DE PARÁSITOS MALARICOS Y OTROS
HAEMOSPORIDIOS EN AVES EN LA ESTACIÓN DEL PLANETARIO
SIMÓN BOLÍVAR MARACAIBO ESTADO ZULIA**



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA
MENCIÓN PARASITOLOGIA**



**PREVALENCIA DE PARÁSITOS MALARICOS Y OTROS
HAEMOSPORIDIOS EN AVES EN LA ESTACIÓN DEL PLANETARIO
SIMÓN BOLÍVAR MARACAIBO ESTADO ZULIA**

Cursante Postgrado: Licda. Glennys Praderes

Tutor: M.V. MSc. José A. Romero P.

Maracay, Febrero 2016

APROBACION

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía y fortaleza

A mis padres por su gran apoyo y consejos

A mi hijo por el gran amor de madre que me enseñó.

AGRADECIMIENTO

La realización de esta investigación hubiese resultado imposible sin los extraordinarios esfuerzos de personas e instituciones que aportaron desinteresadamente su tiempo, conocimientos y apoyo logístico. Gracias al Mv. MSc. José A. Romero P. (Tutor Académico del Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón), por su valioso tiempo.

Al instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón, por su apoyo logístico, la Estación del Planetario Simón Bolívar Maracaibo Estado Zulia por su valiosa colaboración en el lugar de estudio y al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Al personal del Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorio, Centro de Enfermedades Endémicas de Salud Ambiental por su estímulo y conocimientos de buen interés.

RESUMEN

Los parásitos de la malaria, son un grupo diverso de protozoos que infectan mamíferos, aves y reptiles, y son transmitidos mediante la picadura de diversos insectos hematófagos. Entre estos se encuentran; el género *Plasmodium* perteneciente a la familia Plasmodiidae, *Haemoproteus* de la familia Haemoproteidae, *Leucocytozoon* de la familia Leucocytozoidae. Mediante estudio descriptivo de corte transversal se estimó la prevalencia de parásitos maláricos y otros Haemosporidios en aves en la estación del Planetario Simón Bolívar-Maracaibo estado Zulia, 2013. De las 242 aves capturadas y muestreadas, 41 aves resultaron positivas con una prevalencia general del 16,94%; para el género *Plasmodium* 9,5%, *Haemoproteus* 4,55% y microfilarias 2,89% , no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas por edad y sexo del hospedador, siendo las especies más prevalentes *Columbina squammata*. El 19,51% (8/41) de los casos se diagnosticaron hasta especie de parásito *Plasmodium haemamoeba lutzii*, *Haemoproteus cracidarum* y *Haemoproteus ortalidum*. Los resultados de PCR permitieron ampliar el número de aves infectadas para el género *Plasmodium* incriminando a las familias Icteridae y Mimidae. El tipo de comportamiento del ave, su habitat, alimentación y sistema inmune es importante para el estudio de estos hospedadores que presentaron prevalencias elevadas. Es importante el uso de ambos métodos, microscópico y molecular, que nos permita la certificación de resultados y obtener una mejor calidad en los diagnósticos de estos géneros y nuevas especies de parásitos maláricos.

Palabras claves: Aves, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, Hemoparasitos, Zulia, Prevalencia.

SUMMARY

The malaria parasites are a diverse group of protozoa that infect mammals, birds and reptiles, and are transmitted by the bite of various blood-sucking insects. These include: *Plasmodium* genus belonging to the family Plasmodiidae, *Haemoproteus* belonging to the family Haemoproteidae, *Leucocytozoon* belonging to the family Leucocytozoidae. By Using a descriptive cross-sectional study the prevalence of malarial parasites in birds and other Haemosporidios was estimated at Station Planetarium Simon Bolivar-Maracaibo-Zulia, 2013. Of the 242 birds captured and sampled, 41 birds were positive with an overall prevalence of 16.94 %, of these 9.5% belongin to genera *Plasmodium*, *Haemoproteus* 4.55% and 2.89% microfilariae; no statistically significant differences by age and sex of the host was evident, being the most prevalent species *Columbina squammata*. 19.51% (8/41) of the cases were diagnosed to species of parasite: *Plasmodium Haemamoeba lutzi*, *Haemoproteus cracidarum* and *Haemoproteus ortalidum*. The results of PCR allowed us to expand the number of birds infected to the genus *Plasmodium*, incriminating to the families Mimidae and Icteridae. The type of behavior of the bird, its habitat, food and immune system is important for the study of these hosts that showed high prevalence. It is important to use both, microscopic and molecular, methods, allowing us certification results and get a better quality diagnoses of these genera and new species of malaria parasites.

Keywords: Birds, Plasmodium, Haemoproteus, Hemoparasites, Zulia, Prevalence.

INDICE DE CONTENIDO

Introducción	1
Objetivo general y específicos	5
Revisión de literatura	6
1. Antecedentes	6
2. Bases Teóricas	13
2.1 Parásitos sanguíneos	13
2.1.1 Géneros <i>Haemoproteus</i>	14
2.1.2 Géneros <i>Plasmodium</i>	15
2.1.3 Géneros <i>Leucocytozoon</i>	16
2.1.4 Otros Hemoparasitos en Aves	16
2.2 Epidemiología	17
2.3 Vectores de Haemosporidios en Aves.	19
2.4 Ciclo Biológico	20
2.5 Hospedadores	22
2.6 Identificación de las Aves	23

2.7 Células Hospedadoras	23
2.8 Efecto sobre los Eritrocitos	24
2.9 Patogenia	25
3. Sintomatología de las Aves	25
4. Sistema de variables e indicadores	26
Materiales y métodos	27
1. Tipo de investigación	27
2. Descripción del área de estudio	27
3. Población y muestra	28
3.1 Población	28
3.2 Muestra	28
4. Métodos	28
4.1 Determinación de los Géneros y Especies de Hospedadores por Características Morfológicas Externas a través de Observación Directa, Registro Fotográfico y Comparación con la Guía de Aves de Venezuela	29
4.2 Estimación del Numero de Hospedadores Infectados por Haemosporidios en Aves en la Estación del Planetario Simón Bolívar	29
4.2.1 Toma de Muestra Sanguínea	29
4.2.2 Coloración Método de Giemsa Modificado	30

4.2.3 Análisis Microscópico	30
4.2.3.1 Evaluación Morfológica	30
4.2.4 Análisis Molecular	31
4.2.4.1 Extracción de ADN a partir de Papel de Filtro	31
4.2.4.2 Cuantificación de Extracción de ADN	31
4.2.4.3 Cebadores para Amplificación de <i>Haemoproteus</i> , <i>Plasmodium</i> y <i>Leucocytozoon</i>	31
4.3 Comparación de los resultados obtenidos por microscopia óptica y análisis molecular, criterios.	35
5. Instrumentos de recolección de datos.	35
6. Análisis estadísticos	36
Resultados y Discusión	37
1. Determinación de los géneros y especies de hospedadores por características morfológicas externas a través de observación directa, registro fotográfico y comparación con la guía de aves de Venezuela.	37
2. Estimación del número de hospedadores infectados por hemoparásitos en aves en la Estación el Planetario Simón Bolívar.	40
3. Comparación de los resultados obtenidos por microscopia óptica y análisis molecular.	51

Conclusiones	56
Recomendaciones	59
Referencias	60

INDICE DE CUADROS

1. Clasificación taxonómica del género <i>Plasmodium</i> , <i>Haemoproteus</i> y <i>Leucocytozoon</i> .	14
2. Master Mix para PRE-PCR	32
3. Master Mix para segunda PCR sensible a <i>Haemoproteus-Plasmodium</i>	33
4. Master Mix para segunda PCR sensible a <i>Leucocytozoon</i>	33
5. Clasificación Taxonómica de Hospedadores por Géneros y Especies de Aves	39
6. Prevalencia de Parásitos Maláricos según la Familia y Especies de Aves por el Método de Microscopia Óptica	42
7. Especies de Aves infectadas por Géneros de Parásitos Presentes	43
8. Distribución porcentual de casos evolutivos por número de caso.	45
9. Prevalencia de Especies de Aves Positivas por Diagnostico de PCR	50
10. Número de Individuos Infectados por Diagnostico Microscópico y PCR.	52
11 y 12. Cuadro comparativo de resultados positivos por diagnóstico microscópico y PCR	53-54

INDICE DE FIGURAS

1. Ciclo evolutivo de los Haemosporidios.	22
2. Efectos de los Haesmporidios sobre los eritrocitos.	25
3. Proceso de amplificación de ADN de la muestra.	34
4. <i>Thraupis episcopus</i> . Parque Planetario Simón Bolívar.	38
5. <i>Molothrus bonariensis</i> , positivo a <i>Plasmodium</i> y <i>Microfilaria</i> .	40
6. Especie de ave <i>Columbina squammata</i> . Estación de Planetario Simón Bolívar.	41
7. a. Trofozoito; forma evolutiva joven de <i>Plasmodium</i> sp. Ave <i>Mimus gilvus</i> . b. Esquizonte de <i>Plasmodium novyella</i> sp. Ave <i>Quiscalus lugubris</i> . frotis sanguíneo, coloración de Giemsa, (1000x).	44
8. a-. Microgametocito de <i>Plasmodium</i> sp., del ave <i>Columbina passerina</i> . b-. Macrogametocito de <i>Haemoproteus</i> del Ave <i>Columbina squammata</i>	44
9. a-. Trofozoito y b-. Microgameto de <i>Plasmodium haemamoeba lutzi</i> . Ave <i>Mimus gilvus</i> . Coloracion Giemsa (1000x).	45
10. Macrogameto de <i>Haemoproteus</i> sp. Ave <i>Columbina squammata</i> . Se aprecia hipertrofia celular y desplazamiento del núcleo.	46
11. a.- Macrogameto de <i>Haemoproteus cracidarum</i> . b.- Macrogameto de <i>Haemoproteus cracidarum</i> . Ave <i>Columbina squammata</i> , frotis sanguíneo con coloración de Giemsa (1000x).	47

12. Microfilaria a. Ave *Tiaris bicolor*, b. Ave *Icterus nigrogularis*, frotis sanguíneo, coloración Giemsa, (40x). 48
13. Gel de Agarosa al 1,4%, muestras de aves positivas a *Plasmodium-Haemoproteus*. 49

INTRODUCCION

Los parásitos de la malaria, son un grupo diverso de protozoos que infectan mamíferos, aves y reptiles, y son transmitidos mediante la picadura de diversos insectos hematófagos (Gabaldón, 1998). Para su identificación el examen de diversos rasgos morfológicos, es de gran utilidad y esta técnica sigue siendo de gran importancia para el diagnóstico de hemosporidians y debe seguir utilizándose junto con los análisis moleculares.(Tostes *et al.*, 2015); sin embargo, se ha podido describir cientos de especies de estos agentes, por medio de sus secuencias de ADN y han revelado una diversidad mucho mayor, que podría rondar, sólo en las aves, unas 10.000 especies distintas, incluyendo los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* (Gabaldón, 1998). Al respecto, Pérez-Tris y Benchl (2005), encontraron 24 linajes de ADN mitocondrial de parásito que muestra la secuencia entre 0,2 y 12% de divergencia para *Plasmodium* sp., o *Haemoproteus* sp.

Entre estos se encuentran; el género *Plasmodium* perteneciente a la familia Plasmodiidae, *Haemoproteus* de la familia Haemoproteidae, *Leucocytozoon* de la familia Leucytozoideae, todos estos integrados en el orden de parásitos protistas heteroxenos, Haemosporidios (Valkiunas *et al.*, 2005). Las especies de estos géneros afectan a muchas especies de reptiles, aves y mamíferos (Marshall y Williams, 1985) y para completar su ciclo de vida, requieren de un hospedador vertebrado y uno invertebrado, correspondiendo en este caso, al ave y al vector, respectivamente. A su vez, la patología producida varía según la especie de parásito y de hospedador (Romero, 2011).

Los principales vectores del parásito del género *Plasmodium*, productor de la malaria, pertenecen al orden Díptera y a la clase Insecta, considerándose como principales vectores de los géneros *Culex*, *Pipiens*, *Aedes*, (Calnek, 2000). Los insectos del género *Culicoides* (*Ceratopogonidae*) y los *Hipobóscidos* (*Hippoboscidae*) son los principales vectores de *Haemoproteus* y los *Simúlidos* (*Simuliidae*) de *Leucocytozoon* (Valkiunas *et al.*, 2005).

Las infecciones por parásitos sanguíneos se presentan como una de las posibles causas de la pérdida de biodiversidad (Warner, 1968), situando a las especies patógenas como una de las causas más importante de la pérdida de endemismos. Por lo tanto, los controles sanitarios se hacen especialmente relevantes en planes de introducción de especies, con el fin de evitar la posible introducción de agentes patógenos en estas áreas (Cunningham, 1996). No obstante, la posibilidad de que los individuos introducidos en nuevos lugares estén libres de parásitos, o sometidos a una mínima carga parasitaria, podría ser la causa por la que ciertas especies introducidas puedan alcanzar elevados crecimientos demográficos llegando a constituir plagas (Torchin *et al.*, 2003). Por otro lado, también es importante señalar que la enorme pérdida de biodiversidad de vertebrados que estamos sufriendo hace que se estén perdiendo también una considerable diversidad de organismos parásitos asociada a la pérdida de sus hospedadores (Koh *et al.*, 2004).

Las especies aviares en el país, no están exentas de padecer infecciones parasitarias, igualmente como lo señala Kreier (1993), se han realizado diversas investigaciones orientadas a identificar parásitos sanguíneos en aves. Tales investigaciones han canalizado sus esfuerzos para contribuir con el análisis de la ecología comportamental y evolutiva y a determinar el efecto de estos parásitos sobre el hospedero y su aplicación a la conservación de especies aviares en vida. Innumerables estudios sobre la morfología, taxonomía, y el desarrollo de los

parásitos protozoarios de aves, fueron publicados a inicios de 1890, dando lugar a la creación de nuevos géneros y especies (Romero, 2011).

El Planetario, se encuentra situado dentro del Parque Metropolitano de las Peonías y está rodeado de extensas zonas verdes. Esta laguna es un parque natural de alta fragilidad ecológica, presenta una potencialidad que se manifiesta con la diversidad de fauna y flora. En las últimas décadas, este ecosistema ha estado sometido a la intervención del hombre, afectando progresivamente su calidad ambiental, incluyendo afluentes contaminados tales como las cañadas Fénix e Irigorri a través de la descarga de aguas servidas, efluentes de granjas porcinas y desechos sólidos (González y Aldana 2006).

Los investigadores para realizar sus estudios en la naturaleza radican en la imposibilidad para manipular adecuadamente los modelos animales y en la dificultad para alcanzar tamaños muestrales lo suficientemente elevados para poner a prueba sus hipótesis (Martínez, 2010).

La mayoría de las investigaciones referentes a hemoparásitos aviares se desarrollan con base a técnicas de biología molecular; por ser importante en la pesquisa de parásitos hemáticos especialmente en la fase crónica de la enfermedad donde la parasitemia tiende a ser baja. Aun así la Microscopía sigue siendo considerado el "estándar de oro" para el diagnóstico de la malaria porque los parásitos son realmente vistos dentro de las células de la sangre (Atkinson, 2005).

Todo estudio que pretenda ampliar el conocimiento sobre las relaciones entre parásitos y hospedadores en la naturaleza debe comenzar necesariamente por conocer los principales actores intervinientes en la interrelación bajo estudio. El uso de técnicas moleculares está siendo una herramienta eficaz para encuadrar taxonómicamente a los parásitos, especialmente en el caso de protozoos donde la

ausencia de conocimientos sobre los ciclos vitales concretos de muchas especies ha llevado a cometer graves errores de determinación.

En nuestro país no se conocía a profundidad sobre parásitos maláricos aviares sino hasta que el doctor Arnoldo Gabaldón hizo énfasis en este tema y realizó la descripción de distintos géneros y especies a través de las características morfológicas vistas en los frotis sanguíneos, sus estudios son referencia mundial. Esta investigación nos permite conocer la patología que puede comprometer la supervivencia de las aves y la adaptación y vigilancia de nuevos parásitos en su entorno, haciéndose más vulnerable a la extinción.

Esta investigación tiene como objetivo estimar la prevalencia de Parásitos maláricos y otros haemosporidios que contribuya al levantamiento de información, divulgación y toma de conciencia regional y nacional para el reconocimiento y protección de la biodiversidad que hay en estas áreas naturales protegidas dentro de los espacios urbanos, y de esta forma realzar la valoración de la biodiversidad como elemento estético, recreativo, educativo y presumiblemente biológico y ecológico.

1. Objetivo

1.1. Objetivo General

Estimar la prevalencia de Parásitos Maláricos y otros Haemosporidios en Aves en la Estación del Planetario Simón Bolívar Maracaibo estado Zulia 2013.

1.2. Objetivos Específicos

1.2.1. Determinar los géneros y especies de hospedadores por características morfológicas externas a través de observación directa, registro fotográfico y comparación con la guía de aves de Venezuela.

1.2.2. Estimar el número de hospedadores infectados por haemosporidios en aves en la Estación del Planetario Simón Bolívar por microscopia óptica y análisis molecular.

1.2.3. Comparar los resultados obtenidos por microscopia óptica y análisis molecular.

REVISION DE LITERATURA

1. Antecedentes.

White *et al.* (1978), Compararon la bibliografía relacionada con la prevalencia de hematozoa aviar en el Neotrópico, junto con los registros no publicados de los archivos del Centro Internacional de Referencia para hematozoarios aviar, se ha examinado con respecto a la distribución de los géneros de parásitos de la familia de acogida y la región. Los parásitos de la sangre de 35.555 aves de 955 especies (80 familias) que se producen en el Neotrópico sirvieron de base para las comparaciones. Sólo 3.743 individuos (10,5%) albergaban una o más especies de hematozoa. El *Haemoproteus* era la forma más comúnmente observado con una prevalencia 7,4%, seguido por el *Plasmodium* (1,9%), microfilarias (1,2%), *Trypanosoma* (0,6%), y *Leucocytozoon* (0,2%). En comparación con un estudio similar de distribución Neártica hematozoan aviar, el Neotrópico demostró una prevalencia mucho más baja y una ausencia casi total de *Leucocytozoon*.

Sousa *et al.* (1982), examinaron muestras de sangre de 3.715 aves de cuatro zonas de la República de Panamá. Los Hematozoa estaban presentes en al menos, 142 (50%) de las 281 especies examinadas. Se observó una prevalencia global del 18% de las aves individuales: *Haemoproteus* 9%, *Plasmodium* 5%, *Leucocytozoon* menos de 1%, 2% *Trypanosoma*, *Atoxoplasma*, *Lankesterella* menos de 1% y 3% microfilarias. La prevalencia en cada una de las cuatro áreas de estudio varió de 13% a 28%. La distribución se analizó mediante órdenes, familias y se tabulan especies individuales de *Plasmodium*.

Bennet *et al.* (1991), examinaron 196 aves de 31 especies de 15 familias del noreste de México para parásitos de la sangre; 25 aves (12,8%) de 11 especies albergaban 1 o más especies de hematozoarios. Especies de *Haemoproteus* representaron la mitad del total de infecciones encontradas. *Leucocytozoon simondi* se encontró en México en 2 patos (*Anas diazi*) y esto representa el primer registro de la transmisión de este parásito en México. Los resultados de este estudio se compararon con los obtenidos hace casi 50 años a partir de una encuesta de las aves de la misma área, la prevalencia de ambas muestras fue similar.

Young *et al.* (1993), en un estudio de parásitos de la sangre de aves en Costa Rica, 51 (11%) de las 479 aves muestreadas fueron infectadas por al menos una especie de hematozoan. Catorce de las 60 especies de aves en el estudio fueron examinados por primera vez. Las infecciones fueron más frecuentes en ramphastids y emberizids y poco frecuente en otros grupos taxonómicos. Entre las especies residentes, las infecciones fueron más frecuentes durante la estación lluviosa. Las infecciones causadas por *Haemoproteus* sp., fueron las más frecuentes, mientras que *Plasmodium* sp., *Leucocytozoon* sp., *Trypanosoma* sp., y las infecciones de microfilarias eran raros. La intensidad de las 40 infecciones de *Haemoproteus* en aves adultas fue bajo, con una media de \pm SE de $12,5 \pm 3,7$ células infectadas.

Soares *et al.* (1999), realizaron una investigación del parasitismo de *Plasmodium juxtannucleare* en gallinas sin raza definida, provenientes de criaderos rústicos en el municipio de Seropédica, estado de Rio de Janeiro, Brasil. Se realizaron frotis sanguíneos periféricos, los cuales fueron coloreados con Giemsa diluido. En el examen microscópico se pudo observar en aves con alto índice de parasitemia (>10%) formas parasitarias de trofozoítas y esquizontes en el citoplasma de células de la línea leucocítica y trofozoitos en células de la línea trombocítica. Las observaciones en el presente estudio hacen inferir que la cepa de *P. juxtannucleare*

realiza esquizogonia fanerozóica. Este trabajo constituye el primer hallazgo de formas parasitarias de *P. juxtannucleare* en leucocitos.

Valkiuna *et al.* (2003), capturaron 64 aves de 43 especies en seis localidades en Colombia durante la estación seca en marzo de 1998 e investigados para hematozoa por examen microscópico de frotis de sangre. *Haemoproteus coatneyi*, *Plasmodium vaughani*, *Leucocytozoon* sp., y microfilarias fueron identificados. La prevalencia general de infección fue del 8%. Las prevalencias de infección para *Haemoproteus* sp., *Plasmodium* sp., *Leucocytozoon* sp., y microfilarias fueron 3%, 2%, 2% y 3%, respectivamente. Todas las infecciones haemosporidia encontradas eran de baja intensidad (<1% de eritrocitos infectados). Las bajas prevalencias e intensidades de parásitos haemosporidian en este estudio están de acuerdo con otros registros del Neotrópico.

Valkiunas *et al.* (2004), examinaron 354 Animales para parásitos de la sangre en junio de 2001 y diciembre 2001, lo que representa 141 especies de 35 familias y 15 órdenes en la zona de conservación Guanacaste en el noroeste de Costa Rica, 44 aves (12,4%) estaban infectados con parásitos sanguíneos. Especies de *Haemoproteus* (4,8% de prevalencia), *Plasmodium* (0,6%), *Leucocytozoon* (0,3%), *Trypanosoma* (2,0%), y se registraron microfilarias (7,6%). 12 especies de aves en este estudio fueron examinado para parásitos. Varias nuevas asociaciones parásito-hospedador se identificaron.

Ribeiro *et al.* (2005), analizaron 275 aves passeriformes de pequeños y grandes fragmentos de bosque atlántico, Minas Gerais, Brasil. Los frotis de sangre 27 se utilizaron tanto para el examen microscópico y PCR anidada. La sensibilidad del ensayo de PCR anidada fue mayor que la observada para los frotis de sangre a través de examen microscópico. Alta prevalencia (39,6%) de las infecciones por *Plasmodium* fue detectada por PCR anidada, mientras que el examen microscópico

detectó sólo 16.5% aves positivas. Se observó pobre concordancia entre los resultados de las dos pruebas diferentes. Las aves capturadas en las grandes áreas forestales fueron más infectada que las aves capturadas en las pequeñas áreas (51,9% y 28,5%, respectivamente). La dieta y la participación en bandadas mixtas se correlacionaron con el parasitismo *Plasmodium*. Las aves insectívoras y los que participaron en bandadas mixtas se infectaron con mayor frecuencia (47% y 41,5%, respectivamente) que los otros grupos.

Basto, *et al.* (2006), recolectaron aves pertenecientes a 69 especies y 25 familias en el Parque Nacional Natural Sierra de La Macarena (Colombia), de junio a noviembre del año 2000, y se examinaron para hematozoarios. 82 de las 342 aves (24%) fueron positivos para uno o más hematozoarios. En los preparados sanguíneos de aves positivas, las microfilarias fueron los parásitos más comunes (10,5%), y *Leucocytozoon* el más escaso (0,3%). Otros parásitos observados pertenecieron a los géneros de *Plasmodium* (4,4%), *Trypanosoma* (3,5%), *Hepatozoon* (3,5%) y *Haemoproteus* (3,2%). Las bajas intensidades de parásitos haemosporidios están de acuerdo con otros registros en el neotrópico. La prevalencia de parásitos en esta región es mayor que los niveles encontrados en otros estudios en la región neotropical, pero menores que los niveles encontrados para el área neártica.

Ishtiaq *et al.* (2007), analizaron 699 aves de tres regiones de Asia (Myanmar, India y Corea del Sur) fueron examinados para detectar la infección por parásitos aviares de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*. Las muestras fueron recolectadas entre noviembre de 1994 a octubre de 2004. Se identificaron 241 aves infectadas (34,0%). Se detectaron datos de secuencia del gen del citocromo b de 221 muestras positivas, 34 diferentes linajes de *Plasmodium*, y 41 de *Haemoproteus*. La diversidad del parásito fue más alta en Myanmar seguido por la India y Corea del Sur. La prevalencia del parásito fue diferente entre regiones, pero no en las familias de acogida. Había cuatro linajes de *Plasmodium* y uno de *Haemoproteus* compartida

entre Myanmar y la India y sólo un linaje de *Plasmodium* compartida entre Myanmar y Corea del Sur. No hay linajes que fueron compartidos entre la India y Corea del Sur, a pesar de un número igual de distintos linajes se recuperaron de cada región. Las aves migratorias en Corea del Sur y la India proceden de dos vías migratorias diferentes, por lo que la transmisión cruzada de linajes de parásitos puede ser menos probable. India y Myanmar comparten más especies huéspedes y los tipos de hábitat en comparación con Corea del Sur. La comparación entre el hábitat de baja elevación en la India y Myanmar mostró una diferencia en la prevalencia de haematozoos.

Marzal *et al.* (2011), analizaron la prevalencia y la diversidad genética de los parásitos haemosporidios (orden Haemosporida, género *Plasmodium* y *Haemoproteus*) que infectan a los gorriones (*Passer domesticus*). Tomaron muestras de gorriones (N = 1.820) de 58 localidades en 6 continentes. Todas las muestras se ensayaron usando métodos basados en la PCR. Las muestras de sangre de las aves que resultaron positivas por PCR fueron examinados microscópicamente para identificar la especie de parásitos. Los resultados mostraron que los parásitos haemosporidios de distribución natural de los gorriones se sustituyen por especies de fauna de parásitos de entornos extranjeros del Norte y América del Sur. Por otra parte, los gorriones en las regiones colonizadas muestran una menor diversidad y prevalencia de infecciones parasitarias. Debido a que el gorrión perdió sus parásitos nativos cuando colonizó el continente americano, el liberarse de estos enemigos naturales pudo haber facilitado la invasión en los últimos dos siglos.

Belo *et al.* (2012), analizaron la prevalencia y la diversidad molecular de los parásitos haemosporidios en aves silvestres en las zonas áridas del norte de Venezuela, se evaluaron 527 individuos (11 familias y 20 especies) detectando el ADN mitocondrial de los parásitos. La prevalencia global de parásitos fue de 41%, lo que representa 17 linajes mitocondriales: 7 de *Plasmodium* y 10 de *Haemoproteus*. Dos linajes del parásito se encontraron tanto en las regiones del este y el oeste,

infectando una única especie, *Mimus gilvus*. Estos linajes también están presentes desde el norte al centro de Venezuela, en una variedad de zonas áridas y húmedas. Algunos linajes encontrados en este estudio en el norte de Venezuela también se han observado en diferentes localidades en América, incluyendo las Antillas. A pesar de la amplia distribución de algunos de los linajes de los parásitos que se encuentra en el norte de Venezuela, varios, incluyendo algunos que son relativamente comunes (por ejemplo Ven05 y Ven06), no se han reportado en otros lugares. Se necesitan estudios adicionales para caracterizar el hospedador y la distribución geográfica de linajes de parásitos de malaria aviar, lo que proporcionará una mejor comprensión de la influencia del paisaje, abundancia y diversidad del vector, y la identidad del hospedador en la diversidad y prevalencia de parásitos haemosporidios.

Mijares *et al.* (2012), buscaron la presencia de parásitos maláricos en 47 aves de 12 familias colectadas en el paso migratorio “Paso de Portachuelo”, localizado en el Parque Nacional Henri Pittier (Venezuela). La presencia de los parásitos fue evidenciada por la amplificación de una región de 471 pares de bases del gen citocromo b. Esta región del marcador seleccionado presenta suficiente polimorfismo para identificar la mayoría de los linajes mitocondriales. Por lo que el amplicon obtenido fue secuenciado no solo para identificar el género de los parásitos, sino también para estudiar la diversidad genética de los parásitos presentes en el área de estudio. La prevalencia total encontrada fue baja (11%). En este trabajo se reporta por primera vez *Plasmodium* en aves de las especies *Formicarius analis* y *Chamaeza campanisona* (Formicariidae) y *Haemoproteus* en *Geotry gonlinearis* (Columbidae). Se construyó un árbol filogenético utilizando las secuencias de *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucocytozoon* obtenidas en este estudio junto con secuencias representativas obtenidas en estudios previos. La máxima diversidad genética obtenida entre los dos linajes de *Haemoproteus* (11.70%) y entre los tres linajes de *Plasmodium* (7.86%) encontrados en este estudio, es similar a la máxima diversidad genética obtenida cuando se incluyeron también los linajes obtenidos de trabajos

previos. Estos resultados indican que en el corredor migratorio “Paso de Portachuelo”, hay una muestra representativa de linajes de parásitos, haciendo de esta localidad un lugar atractivo para futuros estudios.

Palinauskas *et al.* (2013), describen un método que genera gran cantidad de ADN purificado de haemosporidians aviar. El método se basa en una característica biológica única de parásitos haemosporidians, a saber, que gametocitos maduros en la sangre pueden ser inducidos a exflagelación *in vitro*. Esto se traduce en el desarrollo de numerosas microgametos, que se pueden separar a partir de células de la sangre del hospedador mediante una simple centrifugación. Los resultados revelaron que este método proporciona oportunidades para recoger el material puro de ADN del parásito, que se puede utilizar como una plantilla para diversos análisis genéticos, incluyendo la secuenciación del genoma de haemosporidians que infectan a aves y lagartos.

Rooyen *et al.* (2013), determinaron la persistencia de Haemosporidio en aves (*Parus major*) recapturados durante varios años. Se usó PCR cuantitativa para medir la parasitemia y se secuenció para determinar la identidad de los linajes comparando con la base de datos MALavi. El 98% de 55 individuos recapturados mostraron infección, todos presentaron infección en al menos un año de captura. 82% de todas las aves positivas sufrieron coinfección, con una diversidad de 17 linajes. La infección por *Plasmodium* y *Haemoproteus* fue muy persistente, con linajes de estos géneros encontrados a lo largo de todos los años de estudio, sin diferencias en la parasitemia individual en las capturas posteriores. Por el contrario, las infecciones por *Leucocytozoon* mostraron un mayor cambio en cuanto a los linajes y al estatus de infección. La parasitemia encontrada fue específica y no hubo relación entre la parasitemia por *Plasmodium* o la condición corporal del hospedador y la presencia de *Leucocytozoon*. Los hallazgos de este estudio sugieren que diferentes géneros de parásitos haemosporidians interactúan de forma diferente con su hospedador y otros

parásitos coinfectantes, influyendo en la persistencia del parásito, a través de la competencia interparasitaria o interacciones inmunológicas de parasito-hospedador.

Tostes *et al.* (2015), analizaron la prevalencia de *Plasmodium* sp., y *Haemoproteus* sp., infectados en aves silvestres en cautiverio en el bosque Atlántico de sureste de Brazil utilizando microscopio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se tomaron muestras de sangre de 119 especies de diferentes aves mantenidas en cautiverio en el IBAMA durante el período de julio 2011-julio 2012. La presencia de parásitos se determinó basándose únicamente en las lecturas del frotis de sangre por microscopía de luz. La prevalencia media de *Plasmodium* sp., y *Haemoproteus* sp., a través de frotis de sangre por examen microscópico y PCR fueron similares (83,19% y 81,3%, respectivamente), con *Caracara plancus* y *Saltator similis* siendo las más parasitadas. La parasitemia media determinada por el recuento microscópico de las formas evolutivas de *Plasmodium* sp., y *Haemoproteus* sp., fue 1,51%. Los resultados obtenidos de este estudio refuerzan la importancia del manejo de aves cautivas, en especial cuando se reintrodujo dentro de lo salvaje.

2. Bases Teóricas

2.1 Parásitos Sanguíneos

Los haemosporidios (Sporozoa: Haemosporida) son un grupo de protistas heteroxenos que requieren de la intervención de insectos dípteros hematófagos como vectores (Valkiunas, 2005). Este grupo engloba diferentes familias de parásitos como Plasmodiidae, Haemoproteidae, Leucocytozoidae que afectan a multitud de especies de vertebrados incluyendo anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Estos parásitos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, donde como en el caso de las aves, pueden llegar a infectar al 70% de las especies examinadas (Atkinson y Van Ripper 1991). Además, desde el punto de vista sanitario, la importancia de estos

parásitos es bien conocida por el elevado número de muertes que ocasionan en humanos (WHO, 1994).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*.

Reino	Alveolata		
Filo	Apicomplexa		
Clase	Aconoidasida		
Orden	Haemosporida		
Familia	Plasmodiidae	Haemoproteidae	Leucocytozoidae
Genero	<i>Plasmodium</i>	<i>Haemoproteus</i>	<i>Leucocytozoon</i>

Fuente: Martínez, 2010.

2.1.1 Género *Haemoproteus*

Se reporta en aves, lagartos y tortugas. Entre las especies más comunes tenemos *Haemoproteus ortalidum*, *haemoproteus columbae*, *haemoproteus* sp., sin embargo Valkiunas *et al.* (2013), hallaron nuevas especies de *Haemoproteus multivolutinus* y *Haemoproteus paramultipigmentatus*. Algunas especies del subgénero *Haemoproteus* se encuentran típicamente en las aves del orden (Columbiformes) y se han encontrado recientemente en aves marinas (Merino *et al.*, 2012).

Su morfología en la sangre periférica de las aves, sólo es posible observar formas sexuales gametocitos. Microscópicamente, los gametocitos tienen forma de salchicha, los esquizontes se encuentran en las células endoteliales del pulmón y tiene forma de esferoide irregular, los macrogametos, forma de salchicha, extremos en torno al núcleo, se caracterizan por tonos de azul intenso y formas redondeadas, los microgametos forma de salchicha, extremos en torno al núcleo, se caracterizan por presentar tonalidades rosa (Ahmed y Mohammed, 1978).

2.1.2 Género *Plasmodium*

El paludismo o plasmodiosis de las aves es una infección causada por la presencia de varias especies del género *Plasmodium* en los eritrocitos y células endoteliales de aves. Entre las especies tenemos *Plasmodium novielae* sp., *Plasmodium giovannolaia* sp., *Plasmodium haemamoeba* sp., *Plasmodium huffia* sp. Su morfología se observan las formas, trofozoitos, esquizontes y gametos, este último tiene forma redonda, ovoide, irregular, se localiza en glóbulos rojos y células endoteliales. Los trofozoitos medianos y adultos tienen de uno a tres granos de pigmento, pequeños, redondos de color marrón claro, por lo general no refringentes, alejado del núcleo. Pueden estar adosados al núcleo o pueden no tocarlo, y su posición dentro del eritrocito también varía, pudiendo ser polar, latero-polar, lateral o ecuatorial los esquizontes se encuentran generalmente en una posición polar o secundaria dentro de la célula del hospedero, pero pueden encontrarse en cualquier lugar dentro de la célula. Se encuentran en los eritrocitos maduros o policromáticos. Son de forma irregular, pero tienden a ser redondo u ovoide. Dentro de cada esquizonte son 4-8 merozoitos. El núcleo principal no está normalmente desplazado (Gabaldón, 1998).

Los Macrogametos son grandes, con forma fundamentalmente alargadas que con frecuencia son anulares y rodean al núcleo de la célula hospedera. Las formas redondas u ovals alternan con los anteriores y desplazan a dicho núcleo hacia uno de los polos ya sea transversalmente en otras posiciones o también hacia los lados del eritrocito. Los microgametos son comúnmente algo más grande que los macrogametos, su forma es redonda u oval, pero puede ser alargado o en forma de media luna, encorvados sobre uno de sus polos del núcleo del eritrocito. El citoplasma ligeramente rosado, es vacuolado hacia la superficie del parásito. El núcleo es diseminado y se confunde con el citoplasma, dándole por lo general un color rosado (Gabaldón, 1998).

2.1.3 Género *Leucocytozoon*

La leucocitozoonosis son infecciones parasitadas causadas por la presencia y acción del género *Leucocytozoon*, en los leucocitos, eritrocitos y otros tejidos. Para este género se reporta especificidad a nivel de familia o subfamilia hospedero; sin embargo, se han descrito más de una especie por familia de aves. La forma de los gametocitos en la sangre varía de acuerdo a la especie y al órgano en el cual el parásito se desarrolla. En la sangre se pueden observar parásitos de diversas formas, que sugieren infecciones mixtas, confundiendo a un investigador poco experto (Fallis y Desser, 1977). Las especies son *L. simondi*, *L. smithi* y su morfología en el gameto causan una marcada distorsión de la célula infectada, los gametos llegan a medir de 14 a 22 micras de largo y la célula parasitada de 45 a 55 micras de largo. No forma depósitos de hemozoína (Quiroz, 2005).

2.1.4 Otros Hemoparasitos en aves

La microfilaria, Nematoda Filarioidea Son gusanos redondos, se pueden encontrar organismos de vida libre y parasitaria, los cuales difieren en su morfología, huésped infectado y estadios de desarrollo (Beck y Davies, 1983). Las formas adultas o filarias se alojan extraintestinalmente entre los órganos, mientras que sus larvas microfilarias se ubican preferencialmente en el plasma sanguíneo.

El *Trypanosoma*, Sarcomastigophora Trypanosomatiidae Este género presenta un fuerte pleomorfismo, que dificulta en gran medida el diagnóstico, en la actualidad se recurren a técnicas de cultivo, e inmunológicas para una identificación más confiable (Nandi y Bennett 1994). Los tripanosomas aviares alcanzan dimensiones de 20-60 mm de largo o más, dependiendo de la especie, son comúnmente alargados; y poseen un kinetoplasto generalmente alejado del extremo posterior, del cual se desprende un flagelo libre.

2.2 Epidemiología

Las aves residentes de Venezuela forman parte de la avifauna de la región Neotropical, la cual tiene peculiaridades que le son muy propias. Primeramente se le juzga como la de aislamiento geográfico más antiguo lo que hace que la endemecidad sea muy grande entre sus especies, y a la vez que ellas sean tan numerosas que se le considere como la más rica y diferente avifauna del mundo. En segundo lugar como consecuencia de las particularidades que se acaban de citar, es de esperar que sus parásitos malaricos también sean en su mayoría muy distintos de los descritos en aves de otras regiones zoogeográficas. En el año 1937 Gabaldón había iniciado sus labores en la Dirección Especial de Malariología, al no existir en la Región Neotropical otros mamíferos infectados con parásitos maláricos, sigue la huella de los doctores Rafael Gonzales y otros que habían encontrado estos en aves (Gabaldón, 1998).

Un 75% de las aves nativas de las islas Hawai se extinguieron en tal desembarco, en 1778 y el presente. En las islas existen tantas aves nativas como exóticas introducidas, pero están separadas espacialmente: las aves nativas se hallan en los bosques húmedos de las tierras altas y las aves introducidas abundan en las tierras bajas. En 1826, un barco ballenero Inglés, el Wellington, introdujo el mosquito *Culex quinquefasciatus* dentro de unos barriles de agua para beber que los marineros vaciaron en la costa. El mosquito se extendió rápidamente por toda la isla, pero los casos de malaria aviar se hicieron frecuentes recién a principios del siglo XX, cuando se produjo la masiva introducción de aves exóticas en las islas, algunas de las cuales estaban infectadas *Plasmodium relictum capistranoae* (Wisnivesky, 2003).

En 1976 los europeos ya habían introducido palomas comunes (*Columba livia*) y la liberación de pájaros mina y de pinzones se llevo a cabo entre 1865 y 1870, hasta alcanzar un total de 160 especies de aves exóticas ingresadas en la isla, de las cuales 50 se establecieron exitosamente. Sin embargo la brusca disminución de la

abundancia de las aves endémicas no surge de la competencia con las aves introducidas, si no de la falta resistencia de los pájaros nativos de malaria aviar. En infecciones experimentales, se pudo demostrar que la mayoría de estos presentaba altas parasitemias y moría en 2 o 3 semanas. En contraste las aves introducidas son genéticamente resistentes *al Plasmodium relictum* y cuando se los expones a infecciones repetidas producen bajas parasitemias y raramente mueren (Wisnivesky, 2003).

Los muestreos históricos de los parásitos haemosporidas de las aves en Nueva Zelandia no han revelado altas tasas de prevalencia en aves nativas. Sin embargo recientemente la mortalidad de las especies de aves nativas mantenida en cautiverio han sido asociadas con infecciones de la malaria aviar (*Plasmodium* sp). Dichos registros han resaltado las preocupaciones concernientes a la posibilidad de un evento epizoótico de la malaria aviar en la avifauna de Nueva Zelandia, similar al que ocurrió en las poblaciones de aves nativas de Hawaii. A diferencia de hallazgos anteriores, aquí se reporta la primera ocurrencia de una alta tasa de prevalencia de *Plasmodium* (50%, 39/78) en un ave endémica de Nueva Zelandia, el campanero de Nueva Zelandia (*Anthornis melanura*), en la isla Tiritiri Matangi. Ya que la tasa de prevalencia fue determinada usando microscopia, es muy posible que sea una subestimación del verdadero valor de prevalencia en esta población. La población del campanero de Nueva Zelandia es productiva y de manera anecdótica está entre las más densa de Nueva Zelandia. Una pequeña población de esta especie que se estableció recientemente, a 20 Km de la isla Tiritiri, presentó una prevalencia de 23% (5/22). El tamaño y el peso de las aves infectadas y las no infectadas no fueron significativamente diferentes. Ningún otro parásito Haematozoa fue detectado dentro de las aves muestreadas (Barraclough *et al.*, 2012).

2.3 Vectores de Haemosporidios de Aves

Cada especie de parásito se asocia con un número restringido de vectores (Lehane 2005; Hellgren *et al.*, 2008) y las diferentes especies de vectores presentan una especificidad diferencial en cuanto a sus especies hospedadoras (Malmqvist *et al.*, 2004). En este contexto, una alta especificidad en la selección de hospedadores por parte de los vectores, alimentándose predominantemente o exclusivamente sobre ciertas especies, podría restringir el contacto entre las especies de parásitos sanguíneos y sus hospedadores (Hellgren *et al.*, 2008). No obstante, también existe la posibilidad de que los vectores sean capaces de consumir sangre de diferentes especies hospedadoras infectándose con diversas líneas de parásitos (Gager *et al.*, 2008), lo que podría facilitar, al menos en parte, el salto de líneas parásitas a nuevas especies hospedadoras.

Los simúlidos (Díptera: Simuliidae) son un grupo de insectos con una amplia distribución, generalmente de color negro y con longitudes que suelen oscilar entre 1 y 5 milímetros. Por otro lado, dentro de la familia Ceratopogonidae destaca la importancia de los insectos del género *Culicoides* que engloba una diversidad de más de 1200 especies.

El ciclo vital de ambos grupos comprende las diferentes fases de una metamorfosis completa, es decir, forma de huevo, larvas y pupa, siendo de esta última de la que emergerá el adulto. En términos generales, simúlidos y *Culicoides* presentan una serie de claras diferencias con respecto a su ciclo vital (Lehane, 2005). Por ejemplo, una importante diferencia ecológica es con respecto a los requerimientos hídricos para realizar sus puestas, ya que los simúlidos prefieren aguas claras y bien oxigenadas de cursos corrientes en rápidos o cascadas, mientras que las especies del género *Culicoides* realizan sus puestas en terrenos fangosos. Además, mientras que los simúlidos son considerados de actividad predominantemente diurna, los

representantes del género *Culicoides* muestran un marcado patrón de actividad nocturna. Por otro lado, los *Culicoides* y simúlidos adultos de ambos sexos, consumen soluciones azucaradas de origen vegetal como fuente de alimento.

Las hembras adultas, con la excepción de unas pocas especies, requieren de una toma de sangre para el desarrollo de sus huevos como fuente proteica de alimento previa a la puesta. Es en este momento cuando las hembras son susceptibles de adquirir los parásitos sanguíneos presentes en el hospedador vertebrado.

2.4 Ciclo Biológico

En el vertebrado, la infección inicia con la invasión del esporozoíto, el cual es inoculado por el vector a los capilares del ave al alimentarse succionando su sangre. Estas son células de forma alargada que miden entre 8–12 μm de longitud por 1,5–3 μm de ancho. Posee cierta rigidez debido a que está recubierto por una doble membrana gruesa, provisto de un diminuto citostoma. Aunque los extremos del esporozoíto son afilados, el anterior es un poco más obtuso, y en él se encuentra el complejo apical (Gabaldón, 1998).

Los esporozoítos duran un corto tiempo (horas) en sangre periférica, luego invaden primeramente las células de Kupffer y de allí a los hepatocitos donde se forma el esquizonte tisular primario el cual consiste en un crecimiento progresivo del parásito con división del núcleo y aumento de tamaño, lo cual deforma la célula hepática. Después de 6 a 12 días, sufre ruptura y se liberan miles de merozoítos tisulares, los cuales van a la circulación para posteriormente invadir los eritrocitos (Botero y Restrepo, 2012) o reinfectar tejidos sólidos. Una vez llevada a cabo la invasión de los eritrocitos, los merozoítos sufren una transformación, y pueden formar células asexuadas conocidas como esquizontes, o sexuales denominadas

macro y microgametos. Las formas sexuales maduras son infectivas para el vector (Van Ripper III *et al.*, 1994).

La reproducción sexual inicia con la gametogénesis en el estómago del vector. Se efectúa en las hembras del mosquito que se infectan al ingerir sangre de un vertebrado infectado que tenga microgametos y macrogametos. En el estómago del mosquito, los microgametocitos comienzan el proceso de exflagelación, en la cual la cromatina se divide en varios fragmentos, que se localizan en la periferia del parásito y originan formas flageladas, móviles, llamadas microgametos, que al liberarse buscan las células femeninas para fecundarlas. Los macrogametocitos maduran y se transforman en macrogametos: en cada uno de estos se forman de uno a dos cuerpos polares que se mueven a la superficie del parásito, para recibir un microgameto que lo fecunda. Ocurre la fusión de sus cromatinas y se conforma el huevo o cigoto, éste se transforma en un oocineto, el cual tiene como blanco las células epiteliales del estómago del mosquito, allí se forma el ooquiste que es redondeado y alcanza un tamaño de 50 μm aproximadamente. En el interior del ooquiste ocurre la división del núcleo y el citoplasma, para dar a origen a los esporozoitos, que se liberan al estallar el ooquiste y se diseminan por el cuerpo del mosquito, luego se localizan de preferencia en las glándulas salivales, donde reposan hasta ser inoculados en el vertebrado (Botero y Restrepo, 2012).

Con la ingesta de un solo eritrocito, el vector podría ingerir al menos un macrogameto y un microgameto, lo que previsiblemente facilitaría, por una mayor proximidad, el encuentro entre gametos en el tubo digestivo del vector.

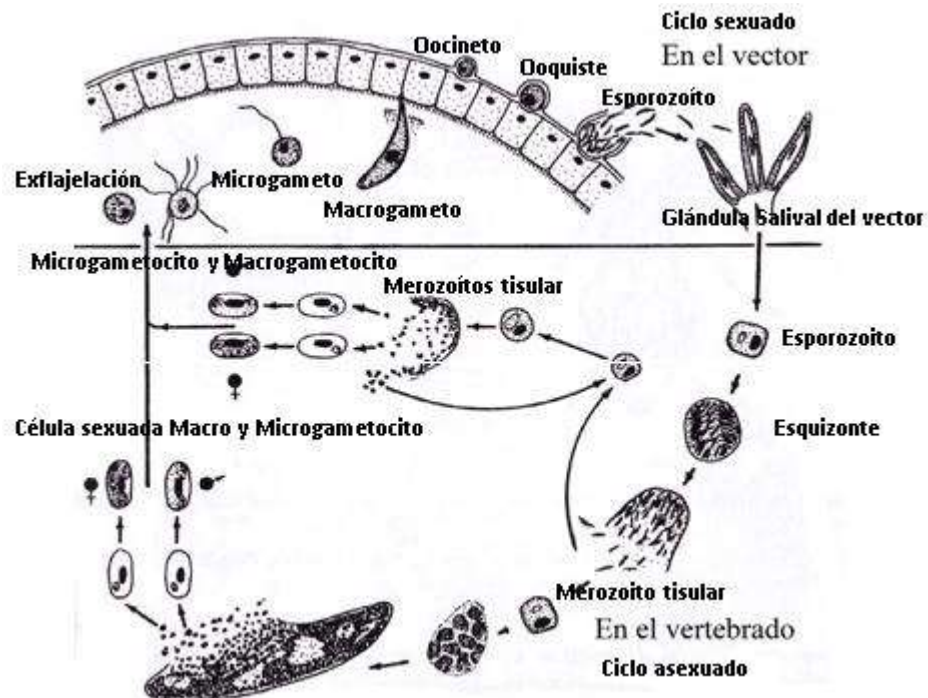


Figura 1. Ciclo evolutivo de los *Haemosporidios*

Fuente: Botero y Restrepo, 2012.

2.5 Hospedadores

Los parásitos maláricos habitan principalmente en los glóbulos rojos de la sangre por que es en ellos donde hacen el comienzo de su reproducción sexual. La familia Amphibia, Reptilia, Aves y Mammalia presentan parásito maláricos. Las aves tiene tres caracteres que permiten diferenciar fácilmente las especies que la forman, ellos son: plumaje, ala y pico. Aunque los primeros se tienen como el carácter fundamental los segundos que son miembros anteriores modificados, determina una condición, que las diferencian de las otras clases de Tetrapoda, el de las migraciones intercontinentales, cuya presencia en alguna especie es necesario tener en cuenta con referencia a la epidemiología de los parásitos maláricos. Los órganos internos, aunque con características que les son propias son equivalentes a los de otros

Tetrápodos. Su reproducción por medio de huevos con dura cascara indican su parentesco cercano con los reptiles (Gabaldón, 1998).

2.6 Identificación de las Aves

La clasificación de las aves se basa en varias características como; tamaño, color, tipo del ala, tipo de pico, entre otras. Para ordenar, es pertinente escoger un grupo de características, lo cual constituye el criterio de clasificación (MacKinnon, 2004). En Venezuela, se cuenta con la edición de una guía de campo con ilustraciones de aves del país titulada: *Birds of Venezuela*, de Steve Hilty (2003), de acuerdo a esta existen 20 órdenes, 82 familias, 589 géneros y 1384 especies de aves registradas en el territorio nacional.

2.7 Células Hospedadoras Sanguíneas

El eritrocito aviar maduro normal es una célula oval con un núcleo oval en posición central. El citoplasma se tiñe de naranja-rosa con la tinción de Wright y debiera tener una textura homogénea. El núcleo de los eritrocitos presenta una cromatina uniformemente condensada, la que se intensifica con la edad. Los eritrocitos maduros de los reptiles son generalmente más grandes que los eritrocitos de las aves. Son células elipsoidales con núcleos situados en posición central o excéntrica. Estos núcleos tienen a menudo márgenes irregulares.

Los eritrocitos policromáticos se ven a menudo en los frotis de sangre periférica de aves normales. Por lo general, estas células representan menos del cinco por ciento de la población eritrocitaria. El grado de policromasia es un buen indicador de la respuesta eritrocitaria regenerativa. Por ejemplo, las aves anémicas que muestran diez por ciento o más de policromasia presentan una adecuada respuesta regenerativa

a la anemia. Los eritrocitos policromáticos tienen núcleos menos picnóticos que los eritrocitos maduros y tienen un citoplasma basófilo.

Las aves y otros vertebrados menores con anemias hipocrómicas suelen tener eritrocitos hipocrómicos o pálidos en los frotis de sangre periférica. Las enfermedades inflamatorias crónicas y la anemia por deficiencia de hierro a menudo presentan hipocromasia en las aves.

La serie eritrocítica juega un papel muy importante en los plasmodios, puesto que dos de sus ciclos más típicos, el ciclo eritrocítico y gametocitogénesis, se llevan a cabo en algunas de sus células (Gabaldón, 1998).

2.8 Efectos Sobre los Eritrocitos

Las modificaciones del tamaño en los eritrocitos elípticos de las aves generalmente se producen sobre su eje mayor, pues este puede alargarse o acortarse. Esta modificación se ha observado particularmente en las infecciones por *Haemoproteus*, pero debe tenerse en cuenta al observar cualquier especie del género *Plasmodium*, para cerciorarse de este efecto conviene comparar la longitud del eritrocito parasitado con la de los que no lo están. Se precisa para este fin seleccionar las partes del extendido en que los glóbulos rojos estén bien colocados, separados unos de otros, de modo que se pueda estar seguro de que la modificación observada no se debe a artificios técnicos (Gabaldón, 1998).

En cuanto al desplazamiento del núcleo se precisa considerar que su forma es la de un elipsoide, como la del eritrocito y que el eje mayor tiene también la misma orientación que la de este último. El núcleo del eritrocito parasitado puede conservar su posición original en el centro, o puede ser desplazado de varias maneras.

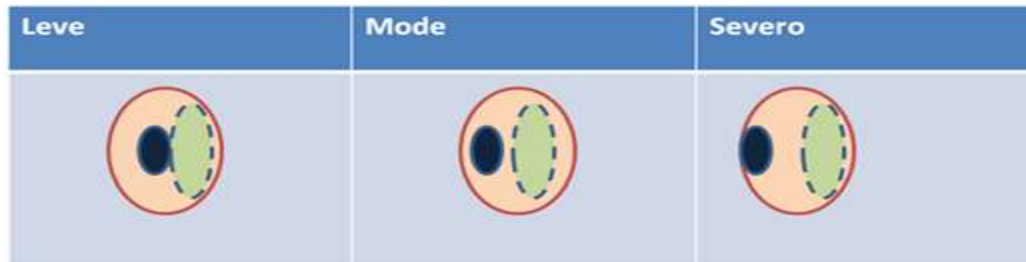


Figura 2. Efectos de los haesporidios sobre los eritrocitos.

La importancia de la observación del efecto del parásito sobre el eritrocito y especialmente sobre su núcleo, pues tiene significación desde el punto de vista taxonómico. Es preciso por ello observar cuidadosamente este efecto para adquirir una orientación sobre el subgénero a que pertenece la especie de parásitos que se estudia en un momento dado (Gabaldón, 1998).

2.9 Patogenia

La patogenicidad varía considerablemente con las especies de parásitos, incluso parásitos de la misma especie pueden diferir en su patogenicidad dependiendo del ave infectada. La patología se asocia con deterioros en la termorregulación; deshidratación; inflamación del hígado, aumento de tamaño del bazo y hemólisis intravascular; hemoglobinuria, presencia de sangre en la orina y anemia severa (Fox *et al.*, 1996).

3. Sintomatología de las aves

Danilewsky, 1890 fue el primero que relaciono la severidad de la infección de las aves con el número de los parásitos en la sangre y describió los síntomas que esta presentan. Sufren debilidad, anemia, apatía, temblores, erizamiento del plumaje, respiración dificultosa, pérdida del apetito y peso, convulsiones, aumento de temperaturas (Gabaldón, 1998).

Los síntomas de la plasmodiosis en las aves incluyen fiebre, anemia (normocítica-normocrómica), vómitos, anorexia, depresión, diarrea, dificultades respiratorias, mucosas cianóticas y posterior muerte. En casos de brotes de esta enfermedad se observa que la prevalencia es mayor en aves jóvenes, con gran mortalidad; en los adultos, por lo general las tasas de mortalidad son bajas y generalmente se asocia a cuadros asintomáticos. Las lesiones patológicas más importantes se observan en hígado, bazo y riñones, cuyos volúmenes se encuentran aumentados con presencia de zonas infartadas; también se presentan zonas de isquemia por embolismos provocados por las formas extra eritrocitarias del parásito (Cordero del Campillo *et al.*, 1999.)

4. Sistema de Variables e Indicadores

Variable	Dimensiones	Indicador	Método
Parásitos Maláricos y otros Haemosporidios en Aves en la Estación el Planetario Simón Bolívar	Prevalencia	Presencia	Microscopia óptica y técnica molecular
	Géneros y Especies de Hospedadores	Descripción Morfológica	Taxonomía de aves
	Géneros y Especies de Parásitos	Descripción Morfológica	Microscopia óptica y técnica molecular

MATERIALES Y METODOS

1. Tipo y Diseño de la Investigación

El tipo de investigación es de carácter epidemiológico - descriptivo ya que el propósito fue determinar el número de hospedadores infectados por hemoparásitos en aves, así como los géneros y especies de hospedadores por características morfológicas externas, por parásito presente en la Estación el Planetario Simón Bolívar, describiendo la enfermedad o característica de una población de aves. Su diseño es no experimental - de campo, porque se efectuó en un lugar y tiempo en que se presentaba el problema objeto de la investigación y de corte transversal, ya que se realizó en un momento y tiempo definido (Thrusfield, 1990; Hernández *et al.*, 2010).

2. Descripción del Área de estudio

La investigación se realizó en el Parque Recreacional Planetario Simón Bolívar (Parque Metropolitano Las Peonías), de las cuales el 30% está ocupado por la Laguna las Peonías en el Municipio Mara, de la ciudad de Maracaibo estado Zulia. Coordenadas: 10°46'11"N 71°40'3"O.

3. Población y Muestra

3.1. Población

La población estuvo representada por las aves endémicas y migratorias presentes en el Parque Recreacional Planetario Simón Bolívar (Parque Metropolitano Las Peonías), en el mes de Abril del año 2013.

3.2. Muestra

La muestra, estuvo constituida por 242 aves, las cuales fueron capturadas en el mes de Abril del año 2013, mediante mallas de neblina y otros métodos de trampeo.

4. Métodos

A los fines de cumplir con los objetivos específicos planteados se procedió a la captura de las aves en el Parque Planetario Simón Bolívar. Para la captura, se emplearon Mallas de Neblina de tamaños de huecos (1,5, 2,5 y 3,5 m) de nylon N° 1 y 2, colocadas en diferentes perspectivas de acuerdo a las condiciones ecológicas del sitio de muestreo, permitiendo la captura del mayor número de aves, con un esfuerzo de muestreo de 3.544 horas/red.

Una vez capturada el ave, fue retirada de la malla y colocada en bolsas de tela fresca, cuya dimensión es adecuada al tamaño de especie en estudio, esto con el objeto de minimizar el estrés y cualquier alteración que comprometa el estado físico del individuo, durante el traslado al sitio de toma de muestra, ubicado a 50 metros del lugar de captura. El tiempo que se empleó para el traslado, la toma de muestra sanguínea, observación de características morfológicas, fotografías y la liberación del ave, fue de quince minutos (Ralph *et al.*, 1996).

4.1. Determinación de los géneros y especies de hospedadores por características morfológicas externas a través de observación directa, registro fotográfico y comparación con la guía de aves de Venezuela.

Para la identificación taxonómica de las aves en campo se observó las características externas del plumaje, en el laboratorio se empleó el registro fotográfico de diferentes partes del cuerpo de cada ejemplar. En ambos casos se utilizó la guía de Aves de Venezuela (Hilty, 2003). Adicionalmente, se precisó el sexo, en caso de especies con dimorfismo sexual y la edad (juveniles y adultos).

4.2. Estimación del número de hospedadores infectados por haemosporidios en aves en la Estación del Planetario Simón Bolívar.

4.2.1. Toma de muestra sanguínea

La toma de muestra de sangre periférica, se realizó, inicialmente inmovilizando el cuello, extendiendo una de las alas, eliminando parte del plumaje y aplicando asepsia, se visualizó y se palpó la vena Ulnar, (Rose *et al.*, 2007). Con un estilete estéril, se le realizó una punción, la primera gota sanguínea se descartó, las sucesivas, se colocaron sobre una lámina portaobjeto, previamente rotulada e identificadas con los números correlativos ascendente desde el 1 al 242, se realizaron tres (03) extendidos fino por ave (Brown y Neva, 1991; Wide *et al.*, 2011). Los mismos se dejaron secar, luego, se fijaron con metanol y se almacenaron en caja porta láminas para su traslado al laboratorio. También se tomaron muestras de sangre en papel de filtro para los análisis moleculares.

Posteriormente, se realizó compresión en el sitio de punción del individuo, con el objeto de detener el sangrado en el ave capturado, para su posterior liberación, (Rose *et al.*, 2007).

4.2.2 Coloración Método Giemsa modificado.

Se preparó la solución de Giemsa, realizando una dilución 1: 20 con agua destilada de pH 6.8 a razón de 3ml por láminas, la dilución se coloca entre el espacio que queda entre las láminas portaobjeto invertida y el vidrio de soporte. Dejar durante 30 minutos, se lava con agua de chorro y se deja secar (Brown y Neva, 1991; Flores y Cabello 2004; Vaccari, 2008; Wide *et al.*, 2011). El colorante preparado fue estandarizado en el laboratorio.

4.2.3 Análisis Microscópico.

4.2.3.1 Evaluación Morfológica.

La evaluación morfológica se realizó para la comprensión de los aspectos fundamentales de la morfología y estructura de los parásitos, de sus capacidades metabólicas y de su fisiología, como base de aplicación al diagnóstico. Cada extendido sanguíneo fue observado con un aumento de 1000X, correspondiendo 10X a ocular y 100X al objetivo de inmersión, recorriendo de izquierda a derecha todos los campos (Vaccari, 2008). Se consideró como positivo o negativo, según la presencia o no de formas parasitarias en las tres réplicas.

Se tomaron Fotomicrografías utilizando como herramienta una cámara digital (Marca Sony modelo DSC-W570), de 16.1 megapíxeles, con zoom de 4 y 5, colocada sobre un trípode y enfocada sobre la lámina a través de un microscopio óptico (Marca Optima), con objetivo de 1000x.

4.2.4. Análisis Molecular

4.2.4.1 Extracción de ADN a partir de papel de filtro

Se cortó con una hojilla estéril una porción del papel de filtro con la muestra de sangre. Se colocó el trozo cortado (aproximadamente 5 mm²) en un vial de 1,5 mL y se agregaron 100 µL de tampón de lisis (TE: Tris-HCl a 10 mM, 0,1 EDTA) e incubó a 55 °C por 15 minutos, transcurrido el tiempo se presionó el papel de filtro contra las paredes del vial, para ello, se utilizó una punta de pipeta limpia y estéril para finalmente incubar el eppendorf a 97 °C por 15 minutos. Se guardó el mismo a -20 °C.

4.2.4.2 Cuantificación de extracción de ADN

Se determinó por espectrofotometría con el equipo ACTGene Nas99, utilizando un volumen de 1,5 µL. Se utilizó como blanco el líquido de re suspensión utilizado (TE o Agua libre de endonucleasas), se sembró la muestra en el pedestal del equipo y se registraron absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las mediciones son reportadas en ng/µL.

4.2.4.3 Cebadores para amplificación de *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucocytozoon*.

Cebadores HaemNF1¹, NR3¹; HaemF², R² y HaemFL³, R2L³ (Citocromo b)

Siguiendo el protocolo de Hellgren *et al.* (2004), se emplearon los cebadores HaemNF1¹ y NR3¹ de secuencias 5'-CATATATAAGAGAAITATGGAG-3' y 5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3' como primera combinación para la PCR anidada, su amplificación inicial fue de 617 pb para los tres géneros, HaemF² y R² de

secuencias 5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3' y 5'-GCATTATCTGGATGATAATGGT-3' (Benschet *al.*, 2004) , ya que las mismas permiten la amplificación de linajes *Haemoproteus* y *Plasmodium*, HaemFL³ y R2L³ correspondientes a las secuencias 5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3' y 5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3' permiten la amplificación de linajes de *Leucocytozoon*.

Para la primera PCR (HaemNF1¹ y NR3¹) se utilizaron 10 µL de ADN en cada reacción y para la PCR anidada (HaemF² y R²; HaemFL³ y R2L³) 5 µL de la PCR externa en cada reacción, los programas se llevaron a cabo en un Termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf).

Se dispensaron los reactivos a usar. Se calculó la *Master-Mix* para procesar 12 muestras, para lo cual se siguieron las indicaciones de los cuadros 1 (preamplificación), 2 (para detectar *Haemoproteus-Plasmodium*) y 3 (para detectar *leucocytozoon*).

Cuadro 2: Master Mix para PRE-PCR

Componente	Stock	[] Final	V 25µL
Buffer 10x	10x	1x	2,5µL
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,75µL
Dntps	10mM	0,2mM	0,5µL
HaemNR3	10mM	0,2mM	0,5µL
HaemNF1	10mM	0,2mM	0,5µL
<i>Taq</i>	5 U/µL	5 U/µL	0,1µL
H ₂ O			15,15µL
ADN			5µL

Cuadro 3: Master Mix para segunda PCR sensible a
Haemoproteus-Plasmodium

Componente	Stock	[] Final	V 25 μ L
Buffer 10x	10x	1x	2,5 μ L
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,75 μ L
dntps	10mM	0,2mM	0,5 μ L
HaemF ²	10mM	0,2mM	0,5 μ L
HaemR ²	10mM	0,2mM	0,5 μ L
<i>Taq</i>	5 U/ μ L	5 U/ μ L	0,1 μ L
H ₂ O			15,15 μ L
ADN			5 μ L

Cuadro 4: Master Mix para segunda PCR sensible a
Leucocytozoon

Componente	Stock	[] Final	V 25 μ L
Buffer 10x	10x	1x	2,5 μ L
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,75 μ L
dntps	10mM	0,2mM	0,5 μ L
HaemFL ³	10mM	0,2mM	0,5 μ L
HaemRL ³	10mM	0,2mM	0,5 μ L
<i>Taq</i>	5 U/ μ L	5 U/ μ L	0,1 μ L
H ₂ O			15,15 μ L
ADN			5 μ L

Se realizó PRE-PCR (primera fase de PCR anidada) a 10 muestras sospechosas de ser positivas a malaria aviar. Una vez aislado el ADN se realizó la segunda PCR para confirmar si se trata de *Haemoproteus-Plasmodium* o *Leucocytozoon*.

El programa de la PCR externa fue de desnaturalización inicial de ADN a 94 °C por 3 minutos, luego 20 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 50 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 45 segundos y la última extensión a 72 °C por 10 minutos. El programa de la PCR anidada será idéntico al externo pero a excepción de 35 ciclos de repetición.

PCR anidada				
1. Desnaturalización Inicial	2. 35 ciclos			3. Elongación
94°C 3min	2.1 Desnaturalización	2.2 Hibridación	2.3 Elongación	
	94°C 30seg	50°C 30seg	72°C 45seg	72°C 10min
Prmers , HaemF ² y R ² de secuencias 5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3' y 5'-GCATTATCTGGATGATAATGGT-3' Amplifican linajes de <i>Plasmodium</i> y <i>Haemoproteus</i>				
HaemFL ³ y R2L ³ de secuencias 5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3' y 5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3'amplifican linajes de <i>Leucocytozoon</i> .				

Figura 3. Proceso de amplificación de ADN de la muestra.

De las 242 aves capturadas solo se pudo tomar 223 muestras de sangre en papel de filtro. Se comenzó a realizar PCRs a las muestras de aves procedentes del Zulia, en vista de la baja tasa de infección, se realizaron pool de DNA de muestras de aves con 5 µL de cada una con sus respectivos códigos, con la idea de que posteriormente se hicieran aperturas de aquellos pool que resultasen positivos y así ubicar la muestra exacta.

Para comprobar si las PCR fueron amplificadas con éxito, se corrió 1,5 ML del producto final de la PCR en un gel de agarosa al 1,4% teñido con *SYBR-Safe* para observar el producto amplificado.

4.3 Comparación de los resultados obtenidos por microscopia óptica y análisis molecular.

Criterios:

- Algunos estudios tales como los de Richard *et al.* (2002), Waldenstrom *et al.* (2004) y Garamszegi (2010), mostraron la sensibilidad de los análisis moleculares, la PCR puede enmascarar la presencia de más de un parásito en la sangre, en particular en aves con baja parasitemia por lo que tiene que ir acompañado de un diagnóstico microscópico.
- La identificación de las especies de haemosporidiosis se produce a través características observadas por microscopía, como la etapa eritrocítica, incluyendo la longitud, anchura, área, tamaño y número de gránulos hemozoina.
- La técnica de Microscopia Óptica sigue siendo de gran importancia para el diagnóstico de haemosporidiosis y debe seguir utilizándose junto con los análisis moleculares.

5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Entre los recursos empleados para la recolección de los datos, se contempló el uso de fichas de identificación para el momento de la captura de las aves, en las cuales se registraba la posible especie aviar a la que pertenecía el animal y se detallaba cuántos extendidos sanguíneos se realizaron con la muestra. Además, se realizó registro fotográfico de cada captura.

6. Análisis estadísticos

La serie de datos, que se recolectaron en planillas del censo de avifaunas, se digitalizaron en una planilla de cálculos, empleando el programa Microsoft Office Excel. En la cual, un conjunto de columnas identificadas por letras se le asigna los campos de las variables y las filas, se le ingresa la información obtenida de cualquier naturaleza, esta última va a corresponder al número de registros obtenidos, de esta manera se construye una matriz de datos para los procedimientos estadísticos. Se utilizó medidas de tendencia central con la media y desviación estándar, fundamentada en la estadística descriptiva, para ello se utilizó el programa Epidat versión 3.0. y Epiinfo 3.5.

RESULTADO Y DISCUSION

1.Determinación de los géneros y especies de hospedadores por características morfológicas externas a través de observación directa, registro fotográfico y comparación con la guía de aves de Venezuela.

De las 242 aves muestreadas se clasificaron en dos orden, 26 Passeriformes y 9 no Passeriformes, esta investigación se compara por lo descrito de Basto *et al.*, (2006). Estas aves pertenecen a 17 familias, 31 géneros y 34 especies, (cuadro 5), distribuidas en la Estación del Planetario Simón Bolívar, con un esfuerzo de muestreo de 590 horas/red.

Las aves presentaron una serie de características propias de su familia, género o especie, que son muy importantes de observar para lograr una fácil identificación. Para la clasificación taxonómica se observaron características morfológicas externas en cuanto a su (tamaño, forma del cuerpo, pico, plumaje, color y patas) y sus registros fotográficos digitalizadas donde se observaron con gran detalle, pudiéndose comparar con la guía de aves de Venezuela y clasificarlas por especie, esta metodología coinciden con la de Gabaldón, (1998) y Hilty, (2003).

Muchas especies de aves presentaron características morfológicas externas llamadas dimorfismo sexual; para la clasificación entre el macho y la hembra se observaron características de acuerdo al color de su plumaje y variación del tamaño corporal, mientras que las especies monomórficas que no presentaron características diferenciales solo se pudo determinar la edad. Por medio de características externas, los juveniles presentaron el plumaje más sueltos, presencia de plumones, comisura en el pico, colores opacos, como lo señala Hilty, (2003).

Se clasificaron según el sexo 55 hembras, 33 machos y 154 sin dimorfismo sexual. El porcentaje de aves residentes es del 96,28% y aves migratorias es del 3,72% que pertenecen a las especies de *Dendroica aestiva* y *Parkesia noveboracensis*.

El mayor número de aves muestreados en este estudio pertenecieron a las familia Traupidae y Columbidae, residentes de zonas de rastrojo y zonas abiertas, bordes boscosos, manglar y zonas deforestadas. Estas aves se alimentan de semillas y frutas y su presencia en abundancia se puede deber a la proporción de alimento y refugios; similarmente lo reporta Tostes *et al.* (2015), quienes capturaron estas familias en el bosque del Atlántico Brasileño.

El ave *Thraupis episcopus* (figura 4), es un tipo de ave que carece de dimorfismo sexual, los adultos tienen la cabeza y las partes inferiores del cuerpo de color gris azulado claro, las partes dorsales son azules oscuras, con verde azul brillante en las alas y la cola. El pico es corto y grueso. Los dos sexos son similares, los de edad juvenil son de plumaje de color más claro. La especie *Columbina squammata*, (Figura 5), se distingue por su apariencia escamada, patas cortas y rosadas, cola larga y puntiaguda, tienen ojos rojos, no hay distinciones entre sexos y los juveniles son similares, estas características fueron similares a los descrito por Hilty, (2003).



a



b

Figura 4. a-b *Thraupis episcopus*. Estación del Planetario Simón Bolívar. Maracaibo estado Zulia.

Cuadro 5. Clasificación Taxonómica de hospedadores por Géneros y Especies de aves.

Familia	Género	Nombre Científico	Total de Individuos
1. Accipitridae	<i>Gampsonyx</i>	<i>Gampsonyx swainsonii</i>	1
2. Columbidae	<i>Zenaida</i>	<i>Zenaida auriculata</i>	3
	<i>Columbina</i>	<i>Columbina squammata</i>	24
		<i>Columbina passerina</i>	1
	<i>Leptotila</i>	<i>Leptotila verreauxi</i>	3
3. Cuculidae	<i>Crotophaga</i>	<i>Crotophaga ani</i>	3
4. Trochilidae	<i>Leucippus</i>	<i>Leucippus fallax</i>	6
5. Picidae	<i>Melanerpes</i>	<i>Melanerpes rubricapillus</i>	13
6. Cerylidae	<i>Chloroceryle</i>	<i>Chloroceryle americana</i>	1
7. Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus</i>	<i>Xiphorhynchus picus</i>	2
8. Thamnophilidae	<i>Sakesphorus</i>	<i>Sakesphorus canadensis</i>	1
9. Tyrannidae	<i>Hemitriccus</i>	<i>Hemitriccus margaritaceiventer</i>	2
	<i>Pyrocephalus</i>	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	7
	<i>Inezia</i>	<i>Inezia tenuirostris</i>	2
	<i>Machetornis</i>	<i>Machetornis rixosa</i>	1
	<i>Fluvicola</i>	<i>Fluvicola pica</i>	13
10. Troglodytidae	<i>Campylorhynchus</i>	<i>Campylorhynchus griseus</i>	1
	<i>Troglodytes</i>	<i>Troglodytes aedon</i>	2
11. Polioptilidae	<i>Polioptila</i>	<i>Polioptila plumbea</i>	11
12. Mimidae	<i>Mimus</i>	<i>Mimus gilvus</i>	7
13. Parulidae	<i>Dendroica</i>	<i>Dendroica aestiva</i>	6
		<i>Dendroica erithachorides paraguanae</i>	5
	<i>Sieurus</i>	<i>Sieurus noveboracensis</i>	3
14. Thraupidae	<i>Coereba</i>	<i>Coereba flaveola</i>	2
	<i>Thraupis</i>	<i>Thraupis episcopus</i>	74
15. Cardinalidae	<i>Saltator</i>	<i>Saltator coerulescens</i>	1
16. Emberizidae	<i>Volatinia</i>	<i>Volatinia jacarina</i>	2
	<i>Tiaris</i>	<i>Tiaris bicolor</i>	10
	<i>Sporophila</i>	<i>Sporophila intermedia</i>	1
17. Icteridae	<i>Icterus</i>	<i>Icterus nigrogularis</i>	8
	<i>Quiscalus</i>	<i>Quiscalus lugubris</i>	11
		<i>Quiscalus mexicanus</i>	2
	<i>Molothrus</i>	<i>Molothrus bonariensis</i>	12
	<i>Gymnomystax</i>	<i>Gymnomystax mexicanus</i>	1
Total			242

2. Estimación del número de hospedadores infectados por hemoparásitos en aves en la Estación del Planetario Simón Bolívar.

De las 242 aves capturadas y muestreadas, 41 aves resultaron positivas con una prevalencia general del 16,94%, datos similares reportados por Basto *et al.* (2006), donde obtuvieron una prevalencia del 24%, por el contrario Belo *et al.* (2012), reportaron una prevalencia elevada del 41%. Las diferencia de estas prevalencia obtenida puede deberse a que la presencia de los vectores en estas zonas sea mayor que en la zona de estudio y se puedan relacionar con algunos factores tales como los del clima.

El número de aves infectadas fue de 11 especies (Cuadro 6), todas pertenecientes a los órdenes *Columbiformes* y *Passeriformes*, observándose una prevalencia específica del 26,62%, de especies de aves infectadas, 16,52% presentaron infecciones simples y el 0,41% representa infecciones mixtas.

Las especie de ave *Molothrus bonariensis* (Figura 5), presento infección mixta (Cuadro 7), puede deberse a que existe la posibilidad de que los vectores sean capaces de consumir sangre de diferentes especies hospedadoras de aves, infectándose con varios tipos de parásitos, lo que podría proporcionar el salto de líneas de parásitos a nuevas especies hospedadoras, igualmente a lo señalado por Gager *et al.* (2008).



Figura 5. *Molothrus bonariensis*. Ave positivo a *Plasmodium* y *Microfilaria*.

Los parásitos maláricos principalmente reportados en esta investigación pertenecen a los generos de *Plasmodium* con una prevalencia del 9,5%, *Haemoproteus* 4,55% y otros hemoparasitos como microfilarias 2,89%, hallazgos similares fueron reportados por Valkiuna *et al.* (2003); Valkiuna *et al.* (2004); Basto *et al.* (2006); Ishtiap *et al.* (2007). Estas especies de *Haemoproteus*, *Plasmodium*, y *Leucocytozoon* comprenden un grupo diverso de transmisión vector - parásitos que infectan a las células rojas de la sangre (en el caso de *Leucocytozoon*, también las células blancas) y otros órganos dentro de sus hospedadores vertebrados, descritos por Atkinson y Van Riper, (1991). En nuestro estudio no se observó la presencia del genero *Leucocytozoon*, lo que difiere de Fallis y Desser, (1977), quienes señalan que la escasez de investigaciones sobre *Leucocytozoon* spp., se debe a que las formas parasitarias en sangre periférica son detectables por períodos de tiempo muy cortos, lo que hace difícil la detección e identificación con precisión utilizando métodos oculares tradicionales, aunque, la infección por este género es frecuente.

El mayor número de infecciones del género *Haemoproteus* se observó en las aves del orden Columbiformes (Figura 5) para este estudio (Figura 5), con otras investigaciones reportados por Valkiuna *et al.* (2013) y Basto *et al.* (2006). Estudios similares descritos por Merino *et al.* (2012), señalan que las especies del subgénero *Haemoproteus* se encuentran típicamente en las aves (Columbiformes). Este tipo de infección debe estar relacionada con las características biológicas del hospedador tales como el tipo de nido y la participación de las aves en bandadas con otras especies, contacto con los vectores y cambios fisiológicos que pueden hacer que el ave sea más susceptible a estos hemoparásitos, reportado por Ribeiro *et al.* (2005).



Figura 6. Especie de ave *Columbina squammata* (Orden Columbiforme). Estación del Planetario Simón Bolívar.

Cuadro 6. Prevalencia de Parásitos Maláricos según la Familia y Especies de Aves por el Método de Microscopia Óptica.

Orden	FAMILIA	ESPECIE	Nº DE AVES	INFECTADOS	PREVALENCIA (%)	IC 95%
		<i>Zenaida auriculata</i>	3	1	33,3	0,84-90,57
Columbiformes 4/ 242	Columbidae (9,7%3/31)	<i>Columbina squammata</i>	24	15	62,5	41,05-83,95
		<i>Columbina passerina</i>	1	1	100	1,26-98,74
	Mimidae(6,6% 5/7)	<i>Mimusgilvus</i>	7	5	71,43	29,04-96,33
	Emberezidae (16,7% 2/12)	<i>Tiaris bicolor</i>	10	2	20	2,52-55,61
		<i>Sporophila intermedia</i>	1	1	100	1,26-98,74
Passeriformes 26/242		<i>Icterusnigrogularis</i>	8	5	62,5	24,49-91,48
		<i>Quiscaluslugubris</i>	11	3	27,27	6,02-60,97
	Icteridae (14,7% 5/34)	<i>Quiscalusmexicanus</i>	2	1	50	1,26-98,74
		<i>Molothrusbonariensis</i>	12	2	16,67	2,09-48,41
		<i>Gymnomystaxmexicanus</i>	1	1	100	1,26-98,74
	Thraupidae (6,58% 5/76)	<i>Thraupisepiscopus</i>	74	4	5,41	1,49-13,27
Totales			154	41	26,62	19,32-33,93

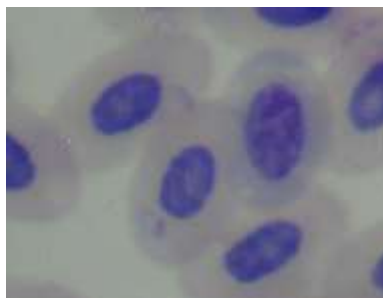
Cuadro 7. Especies de Aves Infectadas por Género de Parásitos Presentes.

Especie de Ave	Nº de aves	Parásito		
		<i>Plasmodium sp.</i>	<i>Haemoproteus sp.</i>	<i>Microfilaria</i>
<i>Zenaida auriculata</i>	3	1	0	0
<i>Columbina squammata</i>	24	5	10	
<i>Columbina passerina</i>	1	0	1	0
<i>Mimus gilvus</i>	7	5	0	0
<i>Tiaris bicolor</i> <i>Sporophila intermedia</i>	10	1	0	1
	1	1	0	0
<i>Icterus nigrogularis</i>	8	4	0	1
<i>Quiscalus lugubris</i>	11	2	0	1
<i>Quiscalus mexicanus</i>	2	0	0	1
<i>Molothrus bonariensis</i>	12	2	0	1*
<i>Gymnomystax mexicanus</i>	1	0	0	1
<i>Thraupis episcopus</i>	74	2	0	2
	154	23	11	8

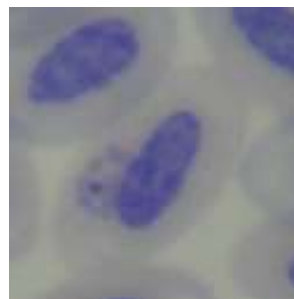
* Presencia de infección mixta

Por otra parte, en la evaluación del frotis sanguíneo se observaron las siguientes formas evolutivas de parásitos maláricos (Cuadro 8): trofozoítos (Figura 7.a), esquizontes (Figura 7.b), microgametos (figura 8.a), macrogametos (figura 8.b). De los 18 géneros de *Plasmodium sp.*, fueron identificados por la presencia de trofozoítos únicamente, para *P. giovannolaia sp.*, se basó en la descripción de un macrogameto y con respecto a *P. novyella sp.*, al menos dos formas evolutivas, esta clasificación se basó en las características morfológicas de los estadios presentes en

etapa eritrocítica, siguiendo la metodología señalada por Valkiunas, (2005) y Gabaldón, (1998), estos resultados son comparables a los reportados por Basto *et al.* (2006). No obstante, para el género *novyella* no se evidenciaron formas parasitarias en células de la serie blanca, lo que difiere Soares *et al.* (1999), quienes observaron la presencia de estos estadios en leucocitos en gallinas sin raza definida en la ciudad de Brazil.



a

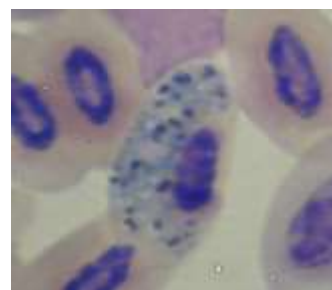


b

Figura 7. a.- Trofozoito; forma evolutiva joven de *Plasmodium* sp. Ave *Mimus gilvus*. b.- Esquizonte de *Plasmodium noviella* sp. Ave *Quiscalus lugubris*, frotis sanguíneo, coloración de Giemsa, (1000x).



a



b

Figura 8. a.- Microgameto de *Plasmodium* sp. Ave *Columbina passerina*, b.- Macrogameto de *Haemoproteus* sp. Ave *Columbina squammata*, frotis sanguíneo, coloración de Giemsa, (1000X).

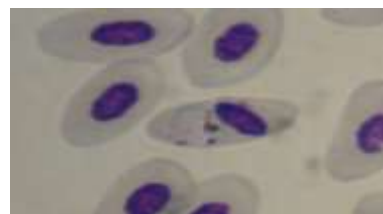
Cuadro 8. Distribución porcentual de casos evolutivos por número de caso.

Parasito	Nº	Forma	%
Género <i>Plasmodium</i>			
<i>Plasmodium</i> sp.	18	Trofozoito	50
		Esquizonte	8,33
		Microgameto	29,17
		Macrogameto	12,5
<i>P. (noviella)</i> sp.	2	Esquizonte	100
		Macrogameto	100
<i>P. (haemamoeba)</i> <i>lutzi</i> .	1	Trofozoito	100
		Microgameto	100
<i>P. (giovanolaia)</i> sp.	2	Macrogameto	100
Genero <i>Haemoproteus</i>			
<i>Haemoproteus</i> sp.	4	Macrogameto	100
<i>Haemoproteus cracidarum</i> .	6	Macrogameto	100
<i>Haemoproteus ortalidum</i> .	1	Macrogameto	100

Se identificó el género *Plasmodium haemamoeba lutzi* (Figura 9), por su forma de trofozoito redondo y grande, el microgameto se acerca al núcleo del eritrocito sin tocarlo y desplaza al núcleo y el eritrocito toma forma redonda, comparándose por Gabaldón y Ulloa (1976), Gabaldón (1998) y Basto *et al.*, (2006), estos últimos identificaron la especie del subgénero *haemamoeba* posible, *P. haemamoeba relictum*.



a



b

Figura 9. a-. Trofozoito y b-. Microgametocito de *Plasmodium haemamoeba lutzi*. Ave *Mimus gilvus*, frotis sanguíneo, coloración de Giemsa, (1000X).

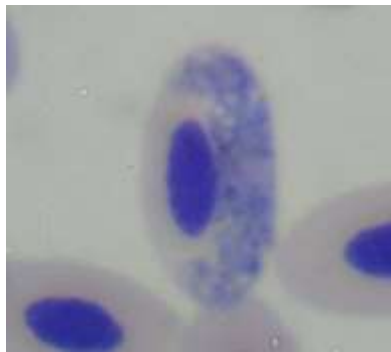
En cuanto al género de *Haemoproteus* la clasificación se realizó basándose en sus gametos, únicas formas parasitarias presente en sangre periférica. Otro dato considerado para la clasificación taxonómica de *Haemoproteus* fue la morfología de la células parasitadas, observándose hipertrofia celular (Figura 10 a. b.), y los núcleos se encontraron desplazados de su sombra nuclear, cabe destacar que Gabaldón, (1998), señala que las alteraciones del tamaño en los eritrocitos de las aves generalmente se producen sobre su eje mayor, este puede alargarse o acortarse y es observado particularmente en las infecciones correspondiente al género de *Haemoproteus*.



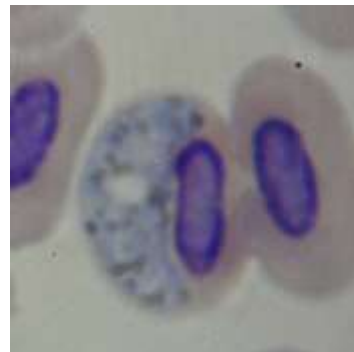
Figura 10. a-b Macrogameto de *Haemoproteus* sp. Ave *Columbiga squammata*. Se aprecia hipertrofia celular y desplazamiento del núcleo. (1000x).

El 19,51% (8/41) de los casos se diagnosticaron hasta especie de parasito maláricos, considerado que las formas sexuales de los (gametos) se diferenciaron por tonos de azul intenso a los macrogametos y los microgametos presentaron tonalidades rosa, así como lo describe Ahmed y Mohammed (1978) y Gabaldón, (1998). Al contrario, Tostes *et al.*, (2015), obtuvieron, en el análisis microscópico un alto porcentaje de trofozoítos y gametos jóvenes, por lo que no les fue posible identificar las especies.

El *Haemoproteus cracidarum*; se observo un macrogameto de tamaño moderado o grande; a su alrededor se observaron varias escotaduras que se marcan en los polos del eritrocito que reflejan lo ameboide del parásito y se adosa a él. El citoplasma presenta algunos gránulos rojizos no refringentes a la luz y los pigmentos son de color marrón oscuro. El núcleo del parásito es ovoide, usualmente situado en el centro (Figura 11). El *Haemoproteus ortalidum*; se identifico un macrogameto alargado, robusto, con un núcleo redondo de color morado, a veces rosado, un citoplasma azul, presencia de una vacuola clara de forma redonda y de gránulos de color marrón, estas características coincide con lo señalado por (Gabaldón, 1998).



a



b

Figura 11. a.- Macrogameto *Haemoproteus cracidarum* b.- Macrogameto *Haemoproteus ortalidum*. Ave *Columbina squammata*, frotis sanguíneo coloración de Giemsa, (1000x).

Otros hemoparasitos fueron observados como las microfilarias (Figura 12), la cual obtuvo una prevalencia específica del 2,89%, hallazgos similares por Silveira *et al.* (2010), en estudios realizados en Brazil, reportaron prevalencia del(6,6%), demostrando aumento de la presencia de microfilarias en aves, otros hallazgo similares por Basto *et al.* (2006), reportando que las microfilarias fueron los parásitos más comunes (10,5%) y estas se ubican en la sangre como lo señala Beck y Davies (1983).

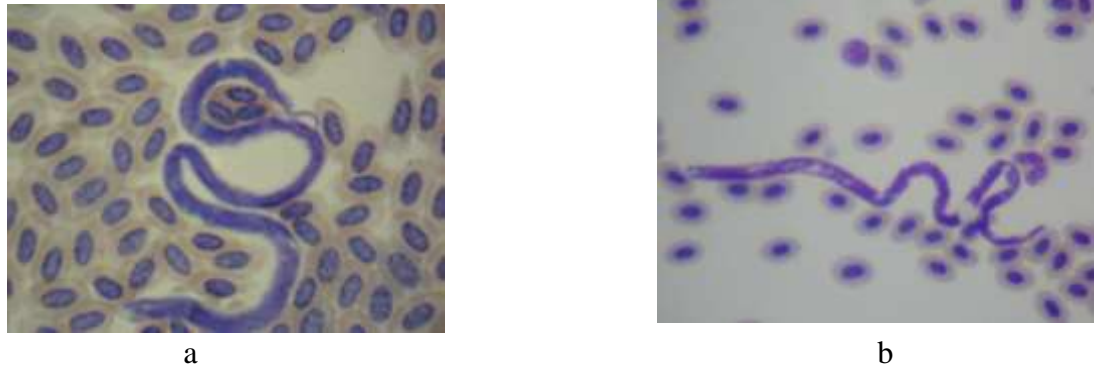


Figura 12. a. Microfilaria. Ave *Tiaris bicolor*, b. Microfilaria. Ave *Icterus nigrogularis*, frotis sanguíneo, coloración Giemsa, (40x).

Según la prevalencia por el sexo se precisó 18,18% (10/55) en hembras, 6,06% (2/33) en machos y 18,83% (29/154) de aves sin dimorfismo sexual, con χ^2 : 3,22; gl: 2; p: 0,1992, no hubo relación estadísticamente significativa entre las variables. El 100% de los casos se observaron en aves adultas. Las aves residentes fueron las únicas afectadas, obteniendo una prevalencia de 17,6% (41/233). Sin embargo la diferencias en la distribución de los casos puede estar influenciada por varios factores tales como la inmunidad del ave, la etapa de la infección y el tiempo en el que se establezca las especies de parásito y el hospedador, el sexo, la edad y características tales como la presencia de las hormonas sexuales, basándonos en lo señalado por Valkiunas, (2005).

Para el análisis molecular el número total de aves que se pudo examinar fue 223, resultando 18 aves positivas (Cuadro 9), obteniéndose una prevalencia general del 8,07%, estos resultados concuerdan con los reportes de Mijares *et al.*, (2012) quienes obtuvieron una prevalencia total del 11% para estos parásitos maláricos, lo que difiere en otras investigaciones como Hellgren, (2004), donde reportan una prevalencia elevada del 59%, sin embargo la metodología utilizadas para estos estudio fue similar. Es importante destacar que la gran diversidad de especies de aves

neotropicales, con el gran número de especies endémicas, podría ofrecer un gran potencial para prevalencias muy elevadas de estos parásitos de aves en relación con la Neártica, de igual manera como lo reporta White *et al.* (1978).

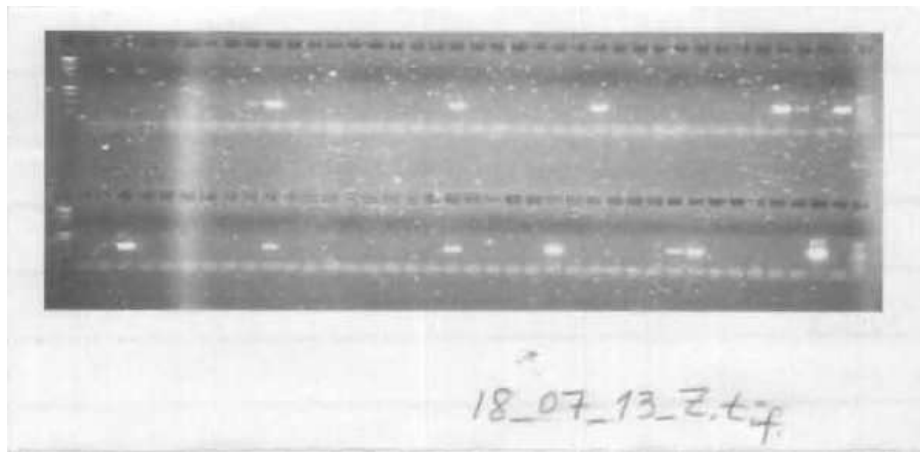


Figura 13. Gel de Agarosa al 1,4%, muestras de aves positivas a *Plasmodium-Haemoproteus*.

En comparación con los registros del analizador del NCBI-BLAST y GenBank (Numero de acceso: JQ764618–JQ764623), se obtuvo una prevalencia del 4,04% para el género *Plasmodium* y 4,04% para el género *Haemoproteus*, estudios similares por Belo *et al.*, (2012), quienes detectaron el ADN mitocondrial de estos parásitos, dando como positivos 7 para *Plasmodium* y 10 para *Haemoproteus*, sin embargo otros hallazgo por Pérez-Tris y Benschl, (2005), observo 24 linages de parásito que muestra la secuencia entre 0,2 y 12% de divergencia, todos ellos de calificar como *Plasmodium* spp., o *Haemoproteus* spp., de acuerdo con la similitud de parásito de secuencias publicadas en el GenBank.

Cuadro 9. Prevalencia específica de especies de aves positivas por diagnóstico de PCR.

Orden	FAMILIA	ESPECIE	Nº DE AVES	INFECTADOS	PREVALENCIA (%)	IC 95%
	Mimidae (6,6% 5/7)	<i>Mimus gilvus</i>	7	5	71,43	29,04-96,33
		<i>Icterus nigrogularis</i>	8	3	37,5	8,52-75,51
		<i>Quiscalus lugubris</i>	11	4	36,36	10,93-69,21
Passeriformes		<i>Quiscalus mexicanus</i>	2	2	100	15,81-
		<i>Molothrus bonariensis</i>	12	2	16,67	2,09-48,41
	Icteridae (14,7% 5/34)	<i>Gymnomystax mexicanus</i>	1	1	-	-
		<i>Thraupis episcopus</i>	74	1	1,35	0,03-7,30
Totales			115	18	15,65	8,58-22,73

En el presente estudio las especies de aves con mayor prevalencia por análisis de PCR fueron *Mimus gilvus* (71,4%), seguido por *Icterus nigrogularis* (37,5%), estudio similar realizado por Belo *et al.* (2012). Esto se debe a que especies de parásitos se pueden asociar con un número restringido de vectores y las diferentes especies de vectores presentan una especificidad en cuanto a sus especies de hospedadores, similarmente como lo señala Lehane, (2005); Hellgren *et al.* (2008).

3. Comparación de los resultados obtenidos por microscopia óptica y análisis molecular.

Una vez obtenido los resultados se observaron por microscopia óptica y PCR 41 y 18 aves positivas respectivamente. De los 41 casos, ocho coinciden en la positividad por la técnica molecular, sin embargo los resultados en cuanto al género fueron no fueron similares.


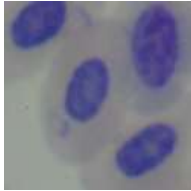
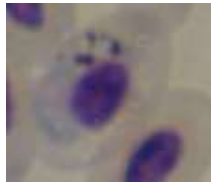

Se puede observar en el (cuadro 10), que la prevalencia por diagnóstico microscópico fue elevada de un 16,94%, comparándose por diagnóstico de PCR con una prevalencia baja del 8,07%, puede ser considerada una prevalencia muy baja, lo que difiere a lo señalado por Tostes *et al.* (2015), quienes presentaron una prevalencia del (83,19% en la microscopía y el 81,3% por PCR), existiendo una gran diferencia entre los resultados del presente estudio. Por otra parte Palinauskas *et al.* (2013) reportan que las muestras de sangre positivas por microscopía pero sin la amplificación por PCR, es importante considerar que la cantidad total de ADN extraído de la sangre es mayor para las aves que los mamíferos debido a que los eritrocitos presentan núcleos, por lo que la gran cantidad de ADN puede inhibir la PCR, dando como resultado falsos negativos, otras investigaciones por Ribeiro *et al.*, (2005) reportan que el resultado también puede ser por la degradación del ADN de la muestra, el paso del tiempo o el fracaso en la extracción de ADN.

Cuadro 10. Números de individuos infectados por diagnóstico microscópico y PCR.



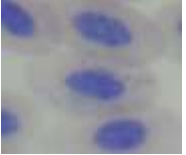
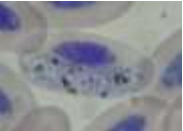
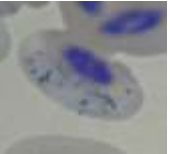
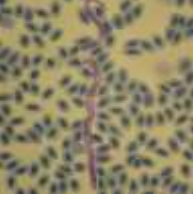
Nombre Científico	Total de Individuos	Individuos Infectados (Análisis por microscopio)	Total de Individuos	Individuos Infectados (Análisis por PCR)
<i>Gamponyxswainsonii</i>	1	0	1	0
<i>Zenaida auriculata</i>	3	1	3	0
<i>Columbina squammata</i>	24	15	24	0
<i>Columbina passerina</i>	1	1	1	0
<i>Leptotilaverreauxi</i>	3	0	3	0
<i>Crotophagaani</i>	3	0	3	0
<i>Leucippusfallax</i>	6	0	2	0
<i>Melanerpesrubricapillus</i>	13	0	13	0
<i>Chloroceryle americana</i>	1	0	1	0
<i>Xiphorhynchuspicus</i>	2	0	2	0
<i>Sakesphoruscanadensis</i>	1	0	1	0
<i>Hemitriccusmargaritaceiventer</i>	2	0	2	0
<i>Pyrocephalusrubinus</i>	7	0	5	0
<i>Ineziatenueirostris</i>	2	0	1	0
<i>Machetornisrixosa</i>	1	0	1	0
<i>Fluvicola pica</i>	13	0	13	0
<i>Campylorhynchusgriseus</i>	1	0	0	0
<i>Troglodytesaedon</i>	2	0	1	0
<i>Polioptila plúmbea</i>	11	0	7	0
<i>Mimusgilvus</i>	7	5	7	5
<i>Dendroicaaestiva</i>	6	0	4	0
<i>Dendroicaerithachoridesparaguanae</i>	5	0	5	0
<i>Sieurusnoveboracensis</i>	3	0	3	0
<i>Coerebaflaveola</i>	2	0	2	0
<i>Thraupisepiscopus</i>	74	4	74	1
<i>Saltatorcoerulescens</i>	1	0	0	0
<i>Volatiniajacarina</i>	2	0	2	0
<i>Tiaris bicolor</i>	10	2	10	0
<i>Sporophila intermedia</i>	1	1	1	0
<i>Icterusnigrogularis</i>	8	5	7	3
<i>Quiscaluslugubris</i>	11	3	10	4
<i>Quiscalusmexicanus</i>	2	1	2	2
<i>Molothrusbonariensis</i>	12	2	11	2
<i>Gymnomystaxmexicanus</i>	1	1	1	1
	242	41	223	18
Prevalencia %		16,94		8,07

Las discrepancias obtenidas entre el diagnóstico parasitológico y molecular (Cuadro 11), puede deberse a que la sensibilidad de los análisis moleculares, la PCR puede enmascarar la presencia de más de un parásito en la sangre, en particular en aves con baja parasitemia, como en algunos casos de coinfecciones, lo que refuerza la necesidad de también realizar un examen microscópico; como lo reporta Richard *et al.* (2002).

Cuadro 11. Resultados positivos de Aves por Diagnostico Microscópico y PCR.

Espece de Ave	Genero y Espece	Forma Parasitaria	Imagen	Diagnostico por PCR
<i>Mimus gilvus</i>	<i>Plasmodium giovanolaia</i>	Macrogameto		Positivo para <i>Haemoproteus</i>
	<i>Plasmodium sp.</i>	Trofozoito		Positivo para <i>Haemoproteus</i>
<i>Icterus nigrogulares</i>	<i>Plasmodium noviella sp.</i>	Macrogameto		Positivo para <i>Haemoproteus</i>
<i>Columbina squamata</i>	<i>Haemoprotus ortalidum</i>	Macrogameto		Negativo

Cuadro 12. Resultados Positivos de Aves por Diagnostico Microscópico y PCR.

Especie de Ave	<i>Genero y Especie</i>	Forma Parasitaria	Imagen	Diagnostico por PCR
<i>Columbina squammata</i>	<i>Plasmodium</i> sp	Microgameto		Negativo
	<i>Plasmodium giovanolaia.</i>	Macrogameto		Negativo
	<i>Plasmodium</i> sp.	Trofozoito y Gameto		Negativo
	<i>Plasmodium</i> sp.	Trofozoito y macrogameto		Negativo
	<i>Plasmodium</i> sp.	Macrogameto		Negativo
<i>Gymnomystax mexicanus</i>	Microfilaria	Microfilaria		Positivo <i>Haemoproteus</i>

Los resultados de PCR nos permitieron ampliar el número de infectados para el género *Plasmodium* a 32, con la pesquisa de 9 amplificados con diagnóstico parasitológico negativo e incrementa el número de casos de infección mixta a 9 con la pesquisa de 8 *Haemoproteus*, con diagnóstico parasitológico positivo a *Plasmodium*, lo que incrementa la prevalencia específica para este género a 13,22% e infección mixta de 0,41% (1/242) a 3,71% (9/242) incriminando a las familias Icteridae y Mimidae. Estos últimos resultados puede atribuirse a la diversidad de parásitos maláricos y que los linages de ADN mitocondrial del parásito muestra la secuencia entre 0,2 y 12% de divergencia para *Plasmodium* sp. o *Haemoproteus* sp como lo señala , Pérez-Tris y Benchl (2005).

En concordancia a lo anterior, se evidencia que la prevalencia por la combinación de ambos métodos diagnósticos es de 20,07% (51/242), por ello, debe tomarse en cuenta las especies parásitas determinadas morfológicamente en cada especie hospedadora, la inclusión de estas nuevas técnicas moleculares está permitiendo obtener una mayor diversidad genética de líneas parásitas de lo esperado (Bensch *et al.*, 2000, 2004), también se discute la necesidad de conservar el uso de las técnicas tradicionales basadas en la observación directa de extensiones sanguíneas para estos parásitos, especialmente en los casos de infecciones parasitarias mixtas (Pérez-Tris y Bensch, 2005; Valkiunas *et al.*, 2006). Cada día existe un mayor consenso sobre la necesidad de compatibilizar el uso de las herramientas tradicionales y moleculares en los estudios de ecología del parasitismo.

CONCLUSIONES

- La abundancia de algunas especies de aves en nuestro estudio, el tipo de comportamiento, su habitad, alimentación y sistema inmune es importante para el estudio de estos hospedadores que presentaron prevalencia elevadas y bajas de estos parásitos maláricos.
- Entre el número de aves muestreadas en la Estación del Planetario Simón Bolívar se clasificaron en 26 Passeriformes y 9 no Passeriformes, pertenecientes a 17 familias, 31 géneros y 34 especies, la mayoría residentes del lugar de estudio. El sexo se identificaron 55 hembras, 33 machos y 154 sin dimorfismo sexual. Las especies monomórficas solo se pudo identificar la edad.
- Para las especies de aves pertenecientes a la familia Thraupidae y Columbidae, tuvieron el mayor número de capturas y se puede deber al tipo de alimento y refugio que la zona de estudio les proporciona.
- La detección de parásitos maláricos en la Estación del Planetario Simón Bolívar, se debe a la presencia y el cumplimiento del ciclo biológico hospedador-vector y las condiciones climáticas esenciales para la transmisión que en este se presenta, con una prevalencia general de 16,94% por métodos parasitológicos, 8,08% por análisis molecular y 21,07% para ambos métodos.

- Se observaron 4 formas de estadios evolutivos para la identificación al género de *Plasmodium*, (trofozoitos, esquizontes, microgametos y macrogametos) y 2 formas para el género de *Haemoproteus* (microgametos, macrogametos). Este último género presenta solamente los estadios evolutivos de microgametos y macrogametos para su identificación en los frotis de sangre periférica, clasificándose taxonómicamente por el daño hacia el eritrocito.
- El 9,5% y 4,04% de hospedadores tienen infección al géneros *Plasmodium* por método parasitológico y molecular respectivamente. Para *Haemoproteus*, 4,55% y 4,04% respectivamente. Estos parásitos de la malaria aviar son un excelente modelo de estudio, dadas sus similitudes con los parásitos de la malaria que afectan a los humanos.
- La especies de aves con infección mixta fueron *Molothrus bonariensis*, con la identificación al género *Plasmodium* y microfilaria por método microscópico y las especies de aves *Mimus gilvus*, *Icterus nigrogularis*, *Quiscalus mexicanus*, *Quiscalus lugubris*, *Gymnomystax mexicanus* a la presencia de géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* por métodos moleculares, este tipo de infección puede atribuirse a diferentes líneas de parásitos presentes en el vector transmisor.
- No hay asociación significativa entre género y especie de hospedador por la ocurrencia de la hemoparasitosis, sin embargo el mayor número de infección por el género *Haemoproteus*, se identificó en la especie de ave *Columbina squammata* con una prevalencia específica del 62,5% por métodos de diagnóstico parasitológico. El método molecular no pesquiso la presencia de este género en la especie *Columbina* pero si en otras especies de aves.

- Se reportó la presencia de otros hemoparasitos como las microfilarias en un 2,89% por diagnostico parasitológico, sin embargo por análisis molecular se pesquiso la presencia de *Haemoproteus* en estos hospedadores aumentando las probabilidades de infección mixta en nuestro estudio.
- El dimorfismo sexual del ave no es un atributo para la ocurrencia de la presencia de parasitosis al igual que la edad, sin embargo las especies de aves del sexo femenino presento el mayor número de infección con el 18,18% y por grupo de edad solamente para las aves adultas ya que este tipo de parásitos maláricos son de infecciones crónicas.
- La identificación de parásitos por métodos moleculares, nos permite comparar diferentes secuencias de ADN con especies que se han encontrados en otros estudios. El diagnostico de reacción en cadena de la polimerasa es una prueba sensible, pero el diagnostico parasitológico obtuvo mejor resultado. Es importante considerar que las aves presentan glóbulo rojo nucleado por lo que su nivel de ADN es más elevado con respecto a otros animales como los mamíferos que no lo presentan. Es importante destacar, para que la PCR tenga éxito son fundamentales los parámetros ya mencionados de los ciclos térmicos, en sus fases de desnaturalización, anillamiento y extensión del cebador, así como los componentes utilizados y el número de ciclos correspondientes.
- Es importante el uso de ambos métodos microscópico y molecular, que nos permita a la certificación de resultados y obtener una mejor calidad en los diagnósticos de estos géneros y especies de parásitos maláricos, sin embargo el análisis microscópico sigue siendo la mejor técnica para la observación de los diferentes estadios evolutivos del parasito, infecciones mixtas y de otros hemoparasitos que puedan estar presente.

RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones de malaria aviar en la zona en El Parque del Planetario Simón Bolívar Maracaibo Estado Zulia.
- Ampliar el estudio para saber las condiciones metabólicas del hospedador de parásitos maláricos, las estrategias de reproducción de los parásitos y supervivencia e intensidad parasitaria.
- Realizar estudio de la población vectorial que contribuyen a enlazar los resultados con las características ecológicas, la susceptibilidad que tienen estas aves al contagio con parásitos Maláricos u otros hemoparásitos y comprobar la presencia de estos vectores involucrados en las transmisión de cada uno de estos.
- Emplear ambos métodos de estudio para realizar la comparación de los resultados por análisis microscópico y análisis molecular y así poder observar la sensibilidad y especificidad de cada uno de estos métodos.
- Se sugiere un tamaño de muestra más grande para estimar con más precisión la prevalencia de parásitos maláricos y otros hemoparasitos entre las aves silvestres y entender la epidemiología de estos parásitos.

REFERENCIAS

- Ahmed, F. and A. Mohammed. 1978. Studies of growth and development of gametocytes in *Haemoproteus columbae*. Kruse. J. Protozool. 25:174.
- Atkinson, C. and C. Van Ripper III. 1991. Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution, and Behavior. In: Loye, J.E. y M. Zuk (Ed.). Oxford Univ. Press, New York, p 19.
- Atkinson, C. 2005. Ecology and Diagnosis of Introduced Avian Malaria in Hawaiian Forest Birds. [Documento en línea]. Servicio geológico de EE.UU. Disponible en: <http://www.usgs.gov/> [Consultado el 6 de Febrero de 2015].
- Barracough, R., T. Cope, M. Peirce and D. Brunton. 2012. First Example of a highly prevalent but low-impact malaria in an endemic New Zealand passerine: Plasmodium of Tiritiri Matangi island Bellbirds (*Anthornis melanura*). In: Paul, E. (Ed.). Emerging avian disease. University of California Press, Berkeley. p 55.
- Basto, N., O. Rodríguez, C. Marinkelle y R. Gutiérrez. 2006. Hematozoarios en Aves del Parque Nacional Natural la Macarena (Colombia). Caldasia. 28:371.
- Beck, J. y J. Davies. 1983. Parasitología Médica. Tercera Edición. Interamericana. México.
- Belo, N., A. Rodríguez, E. Braga; y E. Ricklefs 2012. Diversity of Avian Haemosporidians in Arid Zones of Northern Venezuela. Parasitol. 10:1.
- Bennett, G., A. Aguirre and R. Cook. 1991. Blood Parasites of Some Birds from Northern Mexico. J. Parasitol. 77:38.
- Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldenström, J. and Hellgren, O. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites – multiple cases of cryptic speciation? Evolution 58:1617.
- Botero, D. y M. Restrepo. 2012. Parasitosis humana (5ta Ed.). Panamericana, Medellín.
- Brown, H y F. Neva. 1991. Parasitología clínica. 5ª ed., Interamericana. México. p. 108-178.

Calnek, B. (2000). Enfermedades de las Aves (2da Ed.). El Manual Moderno, México.

Cordero del Campillo, M, F. A. Rojo, A. Martínez, C. Sánchez, S. Hernández, J. Navarrete, P. Díez y M. Carvalho. 1999. Parasitología Veterinaria. Ed. Mc Graw-Hill, Interamericana. pp.: 813-818.

Cunningham, A. 1996. Disease risks of wildlife translocations. *Conserv. Biol.* 10: 349.

Fallis, M. y S. Desser. 1977. On Species Of *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, And Hepatocystis. In Parasitic Protozoa. Vol III. Ed. Kreier J. Academic Press. New York.

Flores, B. y R. Cabello. 2004. Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad., McGraw-Hill Interamericana, México.

Fox, J. H., E. C. Greiner, P. Bain, and R. Jones. 1996. Malaria in a captive Emu (*Dromaius novaehollandiae*) from Florida. *Avian Diseases.* 40: 477-479.

Gabaldón, A. y Ulloa, G. 1976. Las formas exoeritrocíticas de *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *lutzi* Lucena, 1939 y presencia de esta especie en Venezuela. *Bol. Inf. Dir. Malariología y San. Amb.* 16 (4): 299-311.

Gabaldón A. 1998. Malaria Aviar en un País de la Región Neotropical Venezuela. Editorial Interfundaciones, Caracas, Venezuela.

Gager, A. B., J.R. Loaiza, D.C. Dearborn, E. Bermingham. 2008. Do mosquitoes filter the access of *Plasmodium* cytochrome b lineages to an avian host? *Mol. Ecol.* 7, 2552–2561.

Garamszegi L.Z. 2010. The sensitivity of microscopy and pcr-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. *J. Parasitol.* 96:1197-1203.

González, Y. y G. Aldana. 2006. Determinación de batimetría y velocidades de la Laguna de las Peonías considerando los afluentes y descargas existentes. *Ciencia.* 14(1): 168-177.

Hellgren, O., J. Waldenstrom, and S. Bensch. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90:797–802.

- Hellgren, O., S. Bensch and B. Malmqvist. 2008. Bird Hosts, Blood Parasites and Their Vectors - Associations Uncovered by Molecular Analyses of Blackfly Blood Meals. *Molec. Ecol.* 17, 1605–1613.
- Hernández, R., C. Fernández y P. Batista. 2010. *Metodología de la Investigación*.(4^oEd.).McGraw-Hill, México.
- Hilty, S. 2003. *Birds of Venezuela* (2^a ed.). Princeton: New Jersey.
- Ishtiaq, F., E. Gering, J.H. Rappole, A. Rahmani, Y. Jhala, C. Dove, C. Milensky, S. Olson, M. Peirce and R. Fleischer. 2007. Prevalence and Diversity of Avian Hematozoan Parasites in Asia: a regional survey. *43*:382.
- Koh, L; R, Dunn; N, Sodhi; R, Colwell; H, Proctor and V, Smith. 2004. Species coextinctions and the biodiversity crisis. *Science* 305, 132.
- Kreier, J. 1993. *Parasitic Protozoa*. New York and London: Academic Press.
- Lehane, M. 2005. *The biology of blood-sucking in insects* (2^a edition).Cambridge: UniversityPress.
- MacKinnon, B. 2004. *Manual para el desarrollo y capacitación de guías de aves*. México: Amigos de Sian Kaán A.C.
- Malmqvist, B., D. Strasevicius, O. Hellgren, P. H. Adler and S. Bensch. 2004. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Proc. Roy. Soc. Lond. B*: S152–S155.
- Marshal, A. y W. Williams. 1985. *Zoología. Invertebrados*. (7^o Ed.). Sevilla: Reverté.
- Martínez, J. 2010. Interrelaciones entre hospedadores, vectores y parásitos sanguíneos en poblaciones de aves silvestres. Tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Alcalá, Madrid. (Documento en línea), Disponible en: <http://eprints.ucm.es/10194/1/T30981.pdf>. (Consultado en Enero 2015).
- Marzal, A., R. Ricklefs, G. Valkiunas, T. Albayrak, E. Arriero, E. Bonneaud, G. Czirjak, J. Ewen, O. Hellgren, D. Horakova, T. Iezhova, H. Jensen, A. Krizanauskiene, M. Lima, F. De Lope, E. Magnussen, L. Martin, A. Møller, V. Palinauskas, P. Pap, J. Perez-Tris, R. Sehgal, M. Soler, E. Szollo, H. Westerdahl, P. Zetindjiev and S. Bensch. 2011. Diversity, Loss, and Gain of Malaria Parasites in a Globally Invasive Bird. *Plos ONE*. 6,:1.

- Merino, S., J. Hennicke, J. Martinez, K. Ludynia, R. Torres, T.M. Work, S. Stroud, J.F. Masello and P. Quillfeldt. 2012. Infection by *Haemoproteus* Parasites in Four Species of Frigatebirds and The Description of a New Species of *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). *J. Parasitol.*, 98: 388–397.
- Mijares, A.; R. Rosales and A. Silva-Iturriza. 2012. Hemosporidian Parasites in Forest Birds from Venezuela: Genetic Lineage Analyses. *Avian Diseases*. 56, 583–588.
- Nandi, N. y G. Bennett. 1994. Re-description of *Trypanosoma corvi* Stephens and Christophers, 1908 emend. Baker, 1976 and remarks on the trypanosomes of the avian family Corvidae. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89: 145:151.
- Palinauskas V., A. Krizanauskienė, T.A Iezhova, C.V Bolshakov, J. Jonsson, S. Bensch and G. Valkiunas. 2013. A new method for isolation of purified genomic DNA from haemosporidian parasites inhabiting nucleated red blood cells. *Exp. Parasitol.* 133:275-280.
- Pérez-Tris, J. and S. Bensch. 2005. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology*. 131:15.
- Quiroz, H. 2005. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Editorial Limusa, Balderas, México.
- Ralph, J., G. Geupel, P. Pyle, T. Martin, D. De Sante y B. Milá. 1996. *Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres*. California: Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- Ribeiro S., F. Sebaio, F. Branquinho, M. Marini, A. Vago and E. Braga. 2005. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitol.* 130:261- 267.
- Richard F.A., R.N.M Sehgal, H.I Jones and T.B Smith. 2002. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *J. Parasitol.* 88:819-822.
- Romero, M. 2011. Studies of avian malaria and Brazil in the international scientific context (1907-1945). *História, Ciências, Saúde*. 18:2.
- Rooyen, J.; F. Lalubin; O. and P. Christe. 2013. Avian Haemosporidian Persistence and Co-infection in Great Tits at the Individual Level. *M. Journal*, 12:1.
- Rose, K., S. Newman, M. Uhart, y J. Lubroth. 2007. Vigilancia de la Influenza Aviar Altamente patógena en aves sanas, enfermas y muertas, *FAO Roma* 4, pp: 58.

- Soares, C., P. Souza, R. Mota, A. Fonseca y C. Massard. 1999. Parasitismo de Leucocitos y Trombocitos de *Gallus gallus*., por *Plasmodium* (*Novyella*) *Juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *SciELO*.23, 44-47.
- Sousa, O. and C. Herman. 1982. Blood Parasites of Birds from Chiriqui and Panama Provinces in the Republic of Panama. *J. Wildl. Dis.* 18:205.
- Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología Veterinaria Acribia* .Zaragoza-España.
- Torchin, M., K. Lafferty, A. Dobson, V. McKenzie and A. Kuris. 2003. Introduced Species and Their Missing Parasites. *Nature*.421: 628.
- Tostes, R.; U. Vashist; K. Scopel; C. Massard; E. Daemon and M. D'Agosto. 2015. *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction1. *Pesq. Vet.* 35, 67-74.
- Vaccari, E. 2008. Diagnóstico parasitológico de Malaria. MPPS-DGSA-DEA-Laboratorio de Malaria.
- Valkiunas G., P. Salaman And T. Iezhova. 2003. Paucity of haematozoa in Colombianbirds. . *J. Wildl. Dis.*39:445–448.
- Valkiunas, G., A. Anwar, C. Atkinson, E. Greiner, I. Paperna and M. Peirce. 2005. What distinguishes malaria parasites from other pigmented haemosporidians? *TrendsParasitol.*21, 357-358.
- Valkiunas, G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Ratón, FL.
- Valkiunas, G.,T. Iezhova, D. Brooks., B. Hanelt., S. Brant., M. Sutherlin and D. Causey. 2004. Additional observations on blood parasites of birds in Costa Rica. *J. Wildl. Dis.* 40: 555.
- Valkiunas, G., T. Lezhova, E. Evans, J. Carlson, J. Martinez and R. Sehgal. 2013. Two new *Haemoproteus* Species (Haemosporida: Haemoproteidae) From Columbiform Birds *J. Parasitol.*, 99:513–521.
- Van Ripper III, C. Atkinson y T. Seed. 1994. Plasmodia of birds, in *ParasiticProzoa*. New York and London: AcademicPress, 7.
- Waldenstrom J., S. Bensch, D. Hasselquist and O. Ostman. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *J. Parasitol.* 90:191-194.

- Warner, R. 1968. The role of Introduced Diseases in the Extinction of the Endemic Hawaiian Avifauna. *Condor*. 70: 101.
- White, E., E. Greiner, G. Bennett and C. Herman. 1978. Distribution of the Hematozoa of Neotropical Birds. *Rev. Biol. Trop.* 26 Suppl 1:43.
- Wide, A.M., J. Capaldo, N. Zerpa y R. Pabón. 2011. Diagnóstico de laboratorio. En: *undamento en el diagnóstico y control de la malaria*. SA IAE Dr. Arnoldo Gabaldón. 145-82.
- Wisnivesky, C. 2003. *Ecología y Epidemiología de las infecciones parasitarias*. Libro Universitario Regional, Costa Rica. Editorial LUR. Capítulo 6. Efectos de las Infecciones parasitarias sobre las poblaciones de hospederos. P. 160.
- World Health Organization (WHO). 1994. World Malaria Situation in 1992. Part I. *Weekly Epidemiological Record*. 69, 309–14.
- Young, B., M. Garvin and D. McDonald. 1993. Blood Parasites in Birds from Monteverde, Costa Rica. *J. Wildl. Dis.* 29, 555–560. (Documento en línea), Disponible en: <http://vetlab.blogspot.com/2012/11/hematologiaen-vertebrados-menores.html>. Hematología en Vertebrados Menores (Aves y Reptiles). Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA. 2005. (Consultado en Diciembre 2014).