

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

**Prevalencia de haemoparásitos en aves de zonas urbanas y bosques
conservados en la costa ecuatoriana**

VIDA-404

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

(Biólogo)

Presentado por:

Luis Andrés Baquerizo Goya

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico a mi familia que cuando dije que quería estudiar Biología y ser científico me apoyaron desde un principio sin dudar jamás.

Creo que es importante dedicármelo a mi también, ya que muchas veces dudé si la felicidad de verdad de basa en seguir un sueño, con esto me doy cuenta de que soy capaz de cumplir con ellos.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento en principio a mi familia, a mi papá Luis Baquerizo y a mi mamá Yanina Goya, por siempre haber estado ahí buscando la forma de ayudarme a salir a delante a pesar de todas las adversidades.

A mis amigos que durante toda la carrera han sido un apoyo inmenso, en especial a Ivonne, Sara, Gyulianna, Joe, Nicolas, Jair y Johan que siempre estuvieron ahí para mí.

Al profesor Paolo Piedrahita, Peter y al laboratorio de zoología de vertebrados en general que me apoyaron y ayudaron con toda la paciencia del mundo e hicieron que este proyecto sea posible.

Y uno muy especial a Andrea Iglesias que fue una persona muy importante en esta etapa que estuvo ahí para apoyarme de todas las formas posibles para que no sintiera jamás que estaba haciendo las cosas solo.

Declaración Expresa

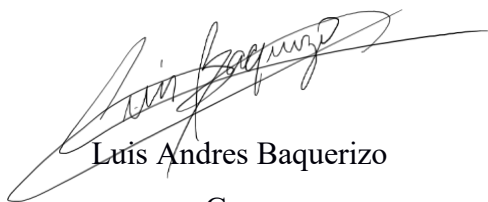
Yo Luis Andres Baquerizo Goya acuerdo/acordamos y reconozco/reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 20 de mayo del 2025.



Luis Andres Baquerizo
Goya

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo, Msc.

Profesor de Materia

Paolo Michael Piedrahita

Piedrahita, PhD.

Tutor de proyecto

Resumen

En este proyecto se analiza la prevalencia y distribución de haemoparásitos en aves de bosques ubicados en zonas urbanas y zonas conservadas de la costa ecuatoriana. El objetivo consiste en analizar la prevalencia de infección entre hábitats con influencia antropogénica o urbana y hábitats conservados, en donde se plantea la hipótesis de que la urbanización incrementa la posibilidad de infecciones. Este análisis es útil para crear información relevante y llenar vacíos que existen en el ecosistema de bosque seco tropical para la toma de decisiones efectivas para conservación y salud pública. Se muestrearon aves con redes de neblina en Bosque Protector y vegetación Prosperina, Bosque Protector Cerro Blanco y Reserva en Finca Arbofino; para el análisis se elaboraron frotis sanguíneos que se observaron bajo microscopio de la mano con análisis PCR. Se llegó a detectar un positivo para Bosque Protector y Vegetación Prosperina con una parasitemia de 1.2% en 10 000 eritrocitos totales. La PCR arrojó cinco positivos, tres para Prosperina, uno en Arbofino y un ave externa; estos datos indican una parasitosis activa dentro de los ambientes urbanos y su presencia en menor medida en zonas conservadas, resultando en que las aves funcionen como reservorio y vectores ecológicos dentro de los ecosistemas

Palabras Clave: Parasitemia, Haemosporida, PCR anidada, parasitos sanguineos

Abstract

In this project, the prevalence and distribution of haemoparasites in birds from forest located in urban and conserved areas along Ecuador's coast are analyzed. The objective is to assess infection prevalence between habitats in anthropogenic/urban influence and conserved habitats, under the hypothesis that urbanization increases the likelihood of infections. This analysis helps generate relevant information and fill gaps in the tropical dry forest ecosystem to support effective decision-making for conservation and public health. Birds were sampled using mist nets at Bosque Protector y Vegetación Prosperina, Bosque Protector Cerro Blanco, and the Arbofino ecologic reserve; for the analyses, blood smears were prepared and examined by microscopy alongside PCR assays. One positive case was detected at Bosque Protector y Vegetación Prosperina, with parasitemia of 1.2% in 10,000 erythrocytes. PCR yielded five positives, three at Prosperina, one at Arbofino, and one external, indicating active parasitism in urban environments and lesser presence in conserved areas, with birds functioning as reservoirs and ecological vectors within these ecosystems.

Keywords: Parasitemia, Haemosporida, Nested PCR, Blood parasites

Índice general

Resumen.....	I
<i>Abstract</i>	8II
Índice general.....	9
abreviaturas	IV
Simbología	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas	VIII
Índice de planos	IX
Capítulo 1	1.
1. Introducción	112
1.1 Descripción del problema.....	3
1.2 Justificación del problema.....	4
1.3 Objetivos	14
1.3.1 Objetivo general.....	14
1.3.2 Objetivos específicos	14
1.4 Marco teórico	14
Capítulo 2.....	18
2. Metodología	19
Capítulo 3.....	23
3. Resultados y análisis	24
Capítulo 4.....	26
4. Conclusiones y recomendaciones	27
4.1 Conclusiones.....	27
4.2 Recomendaciones	28
Referencias.....	20.
Apéndices.....	24

Capítulo 1

1.1 Introducción

Las enfermedades emergentes, en especial las de origen zoonótico, se encuentran en aumento gracias a la recurrente interacción entre humanos, animales y ecosistemas. Se calcula que aproximadamente el 75% de los patógenos causantes de enfermedades emergentes y reemergentes son zoonóticos con alrededor de un 60% de estas se deben a la interacción de animales domésticos y silvestres hacia seres humanos. Factores como el cambio climático y la degradación ambiental han intensificado la transmisión de enfermedades, fragmentando hábitats y aumentando el contacto entre fauna silvestre y poblaciones humanas. Además, la urbanización rápida y la intensificación agrícola han contribuido a la emergencia y reemergencia de estas enfermedades representando un reto para la salud pública global (Erkyihun and Alemayehu, 2022).

En la zona neotropical, los haemoparásitos del orden *Haemosporida*, especialmente *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, constituyen uno de los complejos parasitarios aviares con mayor diversidad genética y plasticidad ecológica (Valkiūnas, 2005). La riqueza de aves en Ecuador es muy notable, sin embargo, el conocimiento que hay sobre la prevalencia y distribución de haemoparásitos es aún escaso, más que nada fuera de las regiones andina y amazónica (Svensson-Coelho et al., 2013). Los haemosporidios, como *Haemoproteus* y *Plasmodium*, presentan una variación considerable en su prevalencia y diversidad a lo largo de diferentes contextos ecológicos en el país. En la costa ecuatoriana, donde la urbanización está invadiendo zonas de bosque y manglares, no se han realizado estudios comparativos que evalúen cargas parasitarias entre zonas con influencia urbana y

bosques conservados. Esta falta de información evidencia la falta de conocimiento en la región neotropical, dando énfasis en la necesidad de llevar a cabo investigaciones para comprender la ecología de estos parásitos y su impacto en la biodiversidad local. Por lo tanto, es importante conocer que los bosques urbanos se definen como un conjunto de árboles y vegetación asociados a un entorno urbano. Estos lugares proporcionan servicios

ecosistémicos como la mitigación de calor, reducción de escorrentía y conservación de biodiversidad. Sin embargo, enfrentan retos gracias al cambio climático, como eventos de calor y sequías que amenazan su salud y supervivencia (Esperon-Rodriguez et al., 2022), por otro lado, un bosque conservado es un área que se mantiene en estado natural sin intervención significativa por parte de actividad humana, de tal manera que permite la preservación de la biodiversidad y estructura ecológica. Tienen la capacidad de resistencia y durabilidad a condiciones adversas, como las sequías (Kefifa & Benabdeli, 2014).

Con base a estos antecedentes, el presente estudio se propone a analizar la prevalencia y distribución de haemoparásitos aviares en bosques urbanos y bosques conservados de la costa ecuatoriana, identificando patrones ecológicos e implicaciones zoonóticas mediante métodos microscópicos moleculares. Los resultados aportaran evidencia para llenar la brecha de información local y sentara las bases para estrategias de conservación y vigilancia.

1.2 Descripción del Problema

Las Enfermedades emergentes en animales, representan una preocupación creciente a nivel global, principalmente las que son transmitidas por vectores que adaptan de forma rápida a nuevos contextos ambientales producidos por el cambio climático y la actividad humana. En este contexto, los haemoparásitos aviares obtienen relevancia, debido a que pueden afectar de forma significativa la salud y dinámica poblacional tanto de aves silvestres como

domésticas. En Ecuador, en la región costa hay una carencia de información notable sobre estos patógenos, lo que crea una brecha grande de conocimiento. Este gran vacío de información se evidencia específicamente en la falta de datos sobre prevalencia, diversidad y distribución de haemoparásitos en ambientes que contrastan como bosque urbanos y conservados. La costa ecuatoriana se caracteriza por mantener distintos niveles de intervención antropogénica, presenta condiciones únicas en cuanto a estructura de hábitats, biodiversidad de aves y abundancia de vectores, haciendo esencial la investigación comparativa sobre la dinámica parasitaria en estos contextos ambientales. La relevancia de esta problemática radica en el potencial de las aves como bioindicadores altamente sensibles a ambientes alterados. La presencia y prevalencia de haemoparásitos reflejan la calidad ecológica de los hábitats que ocupan. Permiten comprender como varían estas prevalencias entre hábitats urbanos, sometidos a fuertes presiones antrópicas, y bosques conservados, menos perturbados y protegidos, es esencial para conocer el impacto que tiene la urbanización sobre la ecología de enfermedades. Este problema es actual dada la creciente incidencia del cambio climático, acelerada urbanización y pérdida de biodiversidad. Estas condiciones se acentúan en regiones tropicales como la costa ecuatoriana, haciendo importante la generación de información que de paso a acciones de conservación efectivas.

1.3 Justificación del Problema

La falta de estudios específicos sobre los haemoparásitos aviares en Ecuador, representa una importante brecha en el conocimiento sobre su prevalencia, diversidad y distribución. Esto impide entender el rol ecológico y epidemiológico que representan, especialmente en ambientes que son intervenidos con frecuencia por actividades humanas. Ecológicamente las aves actúan como bioindicadores sensibles a cambios ambientales (Mekonen, 2017), por lo que estudiar la presencia de estos patógenos es fundamental para evaluar la calidad ecológica de sus hábitats. Este conocimiento es esencial para el desarrollo y toma de medidas

estratégicas eficaces para conservación y restauración ecológica, en especial en áreas urbanas en donde la presión humana puede influir significativamente en la dinámica parasitaria. A partir de esto, la investigación aportará datos que pueden orientar a políticas de conservación ambiental, gestión y planificación urbana sostenible.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Analizar la prevalencia y distribución de haemoparásitos aviáres en zonas urbanas y bosques conservados de la costa ecuatoriana, para la identificación de patrones ecológicos e implicaciones zoonóticas, mediante el muestreo de aves silvestres, registros microscópicos y moleculares de muestras sanguíneas.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Aplicar protocolos éticos y de bioseguridad para la obtención de muestras sanguíneas de aves silvestres en los diferentes puntos de muestreo
2. Relacionar variables ecológicas con la presencia y distribución de haemoparásitos en la costa ecuatoriana
3. Comparar la presencia parasitaria entre zonas urbanas y bosques conservados mediante análisis genéticos y microscopía

1.5 Marco teórico

Durante los últimos años el cambio climático y las actividades antropogénicas han derivado en el cambio en como los patógenos han ampliado su rango de hospedadores debido a interacciones ecológicas (Farhab et al. 2021) Este fenómeno es particularmente preocupante en aves, debido a que las variaciones en la distribución y abundancia de estas llegan a reflejar

el impacto que llega a tener sobre la salud de los ecosistemas. (Rodenhause et al. 1992). De hecho, estos cambios a nivel ambiental favorecen la dispersión de enfermedades de vida silvestre, por resultado de la modificación en las condiciones ambientales que llegan a beneficiar a los patógenos. En estas especies la prevalencia de agentes infecciosos se ve influenciada de forma directa por cambios de temperatura y patrones de precipitación, lo que hace que sean más vulnerables a enfermedades emergentes (Xu et al., 2023).

Las proyecciones a nivel mundial advierten que el aumento en la temperatura promedio del planeta está alterando las isotermas lo que permite a varios vectores de parásitos tener periodos de incubación más cortos y resultando en una rápida propagación de enfermedades (El-Sayed & Kamel, 2020) Investigaciones indican que hay un incremento en la adecuación climática de vectores en altitudes y latitudes, lo que amplía el espectro de hospedadores que pueden volverse susceptibles (Hemert et al., 2014). Además, estudios muestran que infecciones parásitarias por Hemosporidios son comunes en aves migratorias, en donde se muestra que en aves migratorias de largas distancias mantienen una diversidad y prevalencia que aves no migratorias o que migran cortas distancias, aportando de esta forma a la propagación de enfermedades (Schumm et al., 2021)

Las aves son muy buenos indicadores del estado en el que se encuentra un ecosistema, esto gracias a su posición en las redes tróficas, su movilidad y la capacidad que tienen para la detección de cambios en su hábitat. Las especies que residen en un hábitat específico responden de forma rápida a factores como la fragmentación, contaminación y cambios en el clima. Por otra parte, las aves que migran largas distancias permiten conocer las condiciones de diferentes áreas por las que se han movido a lo largo de sus rutas (Tesfahunegny and Mulualem 2017).

Por esto es necesario interpretar correctamente las señales bioindicadoras que las aves presentan, en base a esto es esencial diferenciar el tipo de hábitat que ocupan, particularmente

al comparar bosques urbanos, (los cuales están formado por árboles y vegetación asociada, suelos y fauna que se encuentran en distintos entornos dentro de las ciudades, como áreas residenciales, parques, bosques moldeados por actividades antropogénicas. Estos bosques ofrecen una gran variedad de servicios ecosistémicos que incluyen la mitigación de calor y la conservación de la biodiversidad) (Eesperon-Rodriguez et al., 2022) y bosques conservados son áreas que mantienen su integridad ecológica y presentan un nivel de influencia humana muy bajo. Son zonas que se sujetan a regulaciones que sirven para evitar la pérdida de biodiversidad y son fundamentales para mantener los recursos hídricos y salud ecológica (Watson et al., 2022). Dichas diferencias de estructura y de presión antropogénica general microclimas e influyen a comunidades de vectores distinto, lo que llega a modular la transmisión de haemoparásitos (LaDeau et al., 2015).

Los haemoparásitos que afectan a las aves, comprenden principalmente géneros como Plasmodium, Haemoproteus y Leucocytozoon, estos son organismos que necesitan de un ciclo de vida heteroxeno. Lo que implica la necesidad de un hospedador vertebrado, en este caso las aves y un vector sanguíneo, que por lo general son mosquitos de los géneros Culex Y Aedes para completar su desarrollo (Valkiūnas & Iezhova, 2018). El ciclo de vida de los parásitos causantes de malaria involucra una serie de complejas interacciones entre el huésped y el vector. Luego de la picadura del mosquito, este libera esporozoitos que son transmitidos al hígado, donde se da la replicación, formando alrededor de 90,000 merozoitos por cada célula hepática, estos merozoitos entran al torrente sanguíneo infectando los eritrocitos, dando paso al desarrollo de gametocitos, los cuales son esenciales para transmitir el parásito al vector nuevamente, el mosquito al picar toma los eritrocitos infectados por medio de la sangre y el ciclo vuelve a empezar (Vaughan & Kappe, 2017).

Investigaciones moleculares han revelado una notable diversidad a nivel genético y la existencia de linajes ocultos de parásitos, lo que añade complejidad a las interacciones entre

parásito y huésped. El ciclo de vida de estos parásitos está conformado por varias etapas: esquizogonia, que es la fase asexual donde los parásitos se reproducen en las células sanguíneas del hospedador vertebrado; gametogonia, representa la fase sexual en los vectores donde se forman los gametos y la esporogonia, en donde los esporozoítos se desarrollan luego de la fertilización en el vector. Estas dinámicas presentan importantes implicaciones zoonóticas, ya que permiten que algunos parásitos tengan la capacidad de infectar a diferentes especies (Jalovecka et al., 2018)

El desarrollo esporogónico de *Plasmodium* y *haemoproteus* en los vectores se ve influenciado por ventanas térmicas que oscilan entre los 20 y 30 °C, por lo que el incremento de temperatura en mayores altitudes puede llegar a expandir la capacidad de infección a otras zonas (LaPointe, Atkinson, & Samuel, 2012). Los modelos climáticos sugieren que los hábitats apropiados para los vectores de enfermedades transmitidas por mosquitos podrían llegarse a expandir considerablemente, especialmente en regiones tropicales, esto gracias al cambio climático (Sargent et al., 2022).

A pesar de que se han realizado estudios y reportado infecciones por haemoparásitos en las regiones Andina y Amazónica, la zona de la costa ecuatoriana es un territorio muy poco explorado en cuanto a prevalencia y diversidad de estos parásitos, en especial en ecosistemas como bosque seco tropical. Este desconocimiento se ve exacerbado por la falta de datos sobre la diversidad vectorial local. La falta de datos recolectados de forma continua y sistemática a lo largo del tiempo dificulta la capacidad de entender como pueden cambiar los riesgos de infección en el futuro. Sin esta información es complicado evaluar como los cambios de clima y el crecimiento urbano pueden afectar a la propagación de enfermedades transmitidas por vectores (Svensson et al., 2013; Pibaque & Piedrahita, 2022).

Capítulo 2

2. Metodología.

Este estudio se realizó como un estudio comparativo de diferentes sitios en donde se utilizó un gradiente antrópico a lo largo de la costa. Se seleccionaron tres unidades paisajísticas: Bosque Protector y Vegetación Prosperina con influencia antropogénica de Guayaquil; reserva ubicada en la Finca Arbofino área agroforestal ubicada en Manabí con poca influencia urbana, y Bosque Protector Cerro Blanco como bosque seco tropical conservado. Para Bosque Protector Cerro Blanco y Bosque Protector y Vegetación Prosperina se utilizaron 5 redes de neblina de (2,1 m x 2,4 m) facilitadas por el Laboratorio de zoología de vertebrados de la ESPOL, para Finca Arbofino se utilizaron 13 redes de neblina donde 8 pertenecían a la finca con medidas de (3m x 5m) y las 5 restantes facilitadas otra vez por el laboratorio de zoología de vertebrados de la ESPOL. Las redes fueron colocadas en bloques de 2, 3 y hasta cuatro redes con el fin de abarcar la mayor área posible. Los muestreos se efectuaron desde el mes de febrero 2025 hasta Julio 2025, procurando colocarlas en el rango horario donde se daba la mayor actividad de las aves en cada zona, entre las 6 de la mañana, hasta alrededor de las 12 del mediodía. Las redes se revisaron cada 25 minutos con el fin de evitar el estrés térmico en las aves capturadas. Cada ave capturada fue transferida a una bolsa de tela individual y procesadas en un área en donde se evita la humedad y así no afectar a los frotis sanguíneos realizados. Se realizó un registro de las especies encontradas, además de tomar datos morfométricos de ala, pico y metatarso, además de tomar peso con una balanza o pesola, estado de muda y si se encontraba en época reproductiva. Se marcó al individuo recortando la segunda pluma derecha de la cola, para poder evitar recaptura, sin embargo, para aves como trepatroncos que hacen uso de su cola para su movilización, se recortó un extremo de la segunda pluma del ala derecha, se procuró que el tiempo de manipulación no excediera los 10 minutos por ave para evitar estrés. Para la obtención de muestras sanguíneas, se aplicó el protocolo de extracción de sangre en aves del Laboratorio de Zoología de ESPOL adaptada de Santiago-Alarcón & Ramírez, 2015; Valkiunas, 2005. Con

una aguja 32G, se realizó una punción en la vena braquial del ave; se extrajeron $\leq 80 \mu\text{L}$ usando capilares heparinizados. De forma inmediata se prepararon 2 frotis por individuo, en donde se depositó una gota en un portaobjetos y se extendió sobre este con otro portaobjetos formando un ángulo de 45° . Los frotis fueron fijados en etanol absoluto durante 3 minutos, para poder garantizar la integridad morfológica de los parásitos y células sanguíneas, posterior a esto se secaron con ventiladores portátiles para su almacenamiento. El restante sanguíneo se transfirió a tubos Eppendorf de 2ml que contenían etanol al 99% para el posterior análisis molecular. Todos los tubos y placas fueron etiquetados con un código que contenía las iniciales del área de muestreo, dos letras iniciales del genero y dos letras iniciales de la especie del ave capturada, además del número de individuo capturado por sitio.

Fase de procesamiento de laboratorio

Los Frotis se tiñeron con Giemsa en buffer fosfato, para esto se midió el pH del buffer donde el objetivo de este era que se encuentre alrededor de 7, posteriormente se colocaron las placas en la mezcla durante 60 minutos. Concluido este tiempo las placas se lavaron con agua, se secaron y se almacenaron. Cada placa se examinó mediante microscopía donde se realizó un conteo los eritrocitos por muestra y se analizó la intensidad de infección (células parasitadas/número de eritrocitos totales); la identificación se basó en las claves taxonómicas de Valkiūnas (2005) y Valkiūnas & Iezhova (2022), más tarde se procedió con la toma de fotos de las placas con reportes positivos con ayuda del programa IMAGEJ.

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del material genético se realizó haciendo uso de un protocolo propuesto por Hoffman (2024), este protocolo está basado en la lisis con SDS además de la desproteinización con cloroformo-alcohol isoamílico. Para esto se empezó por etiquetar tubos Eppendorf de 2 mL y de 5 mL, en cada tubo se dispensaron $500 \mu\text{L}$ de buffer de extracción (Tris, EDTA, NaCl, y SDS) además de $20 \mu\text{L}$ de proteinasa K por muestra

sanguínea, se mezcló por vortex y se llevó a incubación a 55 °C en un thermoshaker durante toda la noche o hasta que se observó que la sangre fue digerida por completo y la lisis fue terminada. Cuando la digestión culminó, bajo una campana de extracción se añadió 250 µL a cada muestra de NaCl 5M y se mezcló por inversión. Seguidamente, se agregaron 500 µL de cloroformo= alcohol isoamílico, posteriormente se mezcló y se centrifugó por 15 minutos a 13 000 rpm. Tras haberse centrifugado, se observaron dos fases separadas y una interfase color blanquecino, la fase superior contenía el ADN, de esta se tomaron 650 µL y se colocaron en los tubos de 1,5 mL que fueron etiquetados previamente.

Para conseguir la precipitación del ADN, se colocaron 65 µL de acetato de sodio 3M, que se mezcló por inversión, después se añadieron 455 µL de isopropanol mezclando por inversión nuevamente, los tubos se centrifugaron 20 mins a 13 000 rpm hasta visualizar un pellet blanco en el fondo del tubo. Se decantó el sobrenadante para posteriormente lavar el pellet con 500ul de etanol al 70% con incubación a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 13 000 rpm, se procedió a descartar el etanol para poder secar el pellet, finalmente se rehidrató el pellet en 50 µL de agua ultra pura.

Terminado este proceso se procedió a la cuantificación del material genético por Nanodrop para determinar la concentración.

PCR anidada y electroforesis

Para el diagnóstico se siguió un protocolo propuesto por Pérez-Rodríguez et al. (2013) donde se realizó una PCR anidada para amplificar un fragmento esperado de 500 pb para detectar los tres géneros, Haemoproteus, Plasmodium y Leucocytozoon, en una única PCR de dos rondas. La primera ronda de ciclado se llevó a cabo con los primers Plas 1f y Haem NR3, para la segunda ronda se usaron los cebadores 3760F y HaemJR4 con condiciones de termociclado como se describe en la *tabla 1*. Finalmente se verificaron los productos de la

PCR en un gel de agarosa al 1.5% esperando bandas de 500 pb haciendo uso de un control positivo de ave infectada.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

Detección por microscopía

Mediante la evaluación de los frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, se llegó a detectar un único positivo para hemoparásitos: un individuo de *Vireo chivi* capturado en Bosque Protector Prosperina *anexo 2*. En este espécimen se lograron encontrar 120 eritrocitos infectados por un total de 10 000 eritrocitos totales observados, lo que corresponde a una parasitemia del 1,2%, por otro lado en los demás frotis analizados no se lograron observar glóbulos rojos infectados.

Detección molecular (PRC anidada)

El diagnóstico mediante PCR anidada confirmó 5 positivos en total los cuales incluyen para Bosque protector y vegetación Prosperina: *Vireo chivi* (Reportado como positivo por microscopía), dos *Arremón abeillei*. Para la reserva en finca Arbofino: Una *Claravis pretiosa*. Además de un positivo que no pertenecía a ninguno de los sitios de muestreo propuestos, se trató de un *Cacicus cela* que llegó al laboratorio de zoología de vertebrados de ESPOL en malas condiciones de salud, luego de haber sido recogido por una estudiante. En cuando al punto de muestreo de Bosque protector Cerro Blanco no se detectaron positivos.

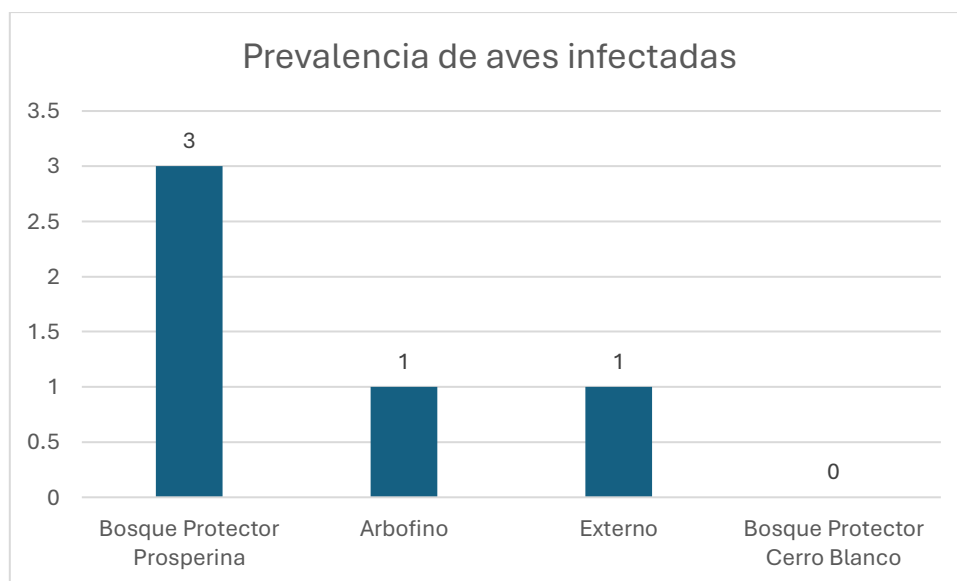


Gráfico 1 *Prevalencia de aves infectadas*

Los resultados muestran una consistencia entre métodos de diagnóstico para el caso de *Vireo chivi* de Bosque y vegetación Prosperina, el positivo por microscopía puso ser corroborado por análisis PCR. Esta baja intensidad de infección observada a nivel celular se puede reconocer como una infección subclínica lo cual es suficiente para que el ave actúe como reservorio y mantenga a la enfermedad circulando en la comunidad o ecosistema en el que habita (McCoy et al., 2016).

La PCR detectó infecciones adicionales, dos *arremon abeillei* en Prosperina y una *Claravis pretiosa* en la reserva de finca Arbofino y un *Cacicus cela* que fue un ave externa a los puntos de muestreo, que no fueron detectadas en la microscopía como se muestra en el *anexo 1*. Esto sugiere que las infecciones en las muestras se presentaron cargas parasitarias bajas, por debajo del umbral de detección por microscopía (Valkiūnas et al., 2009), dando una mayor sensibilidad del enfoque molecular para conocer la presencia de la enfermedad.

Esto sugiere una señal más representativa en los bosques ubicados en zonas urbanas, por otra parte, se reconoce la presencia en menor intensidad en la reserva Arbofino, mientras no existen positivos reportados en Bosque protector Cerro Blanco. Este gradiente concuerda con la hipótesis de que las condiciones e influencias urbanas como la mayor disponibilidad de microhábitats para el desarrollo de vectores, microclimas propicios para el desarrollo de los parásitos, pueden favorecer la transmisión, además es posible observar que en zonas conservadas muestran una menor detección.

Por lo que estos resultados aportan a una línea base local que confirma la presencia de haemoparásitos en las zonas de estudio, con diferencias en cuanto a la presencia de parásitos con una mayor incidencia en bosques localizados en zonas urbanas y su presencia en menor medida en bosques conservados y menor influencia antropogénica.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

Este estudio permitió aportar con información comparativa sobre haemoparásitos aviares en un gradiente de hábitat de la costa ecuatoriana (urbano y conservado). Combinando análisis por microscopía y PCR anidada, donde se pudo evidenciar una parasitosis activa en el hábitat con influencia urbana y su presencia en menor densidad en el hábitat conservado, generando así datos para la conservación, salud pública y ambiental.

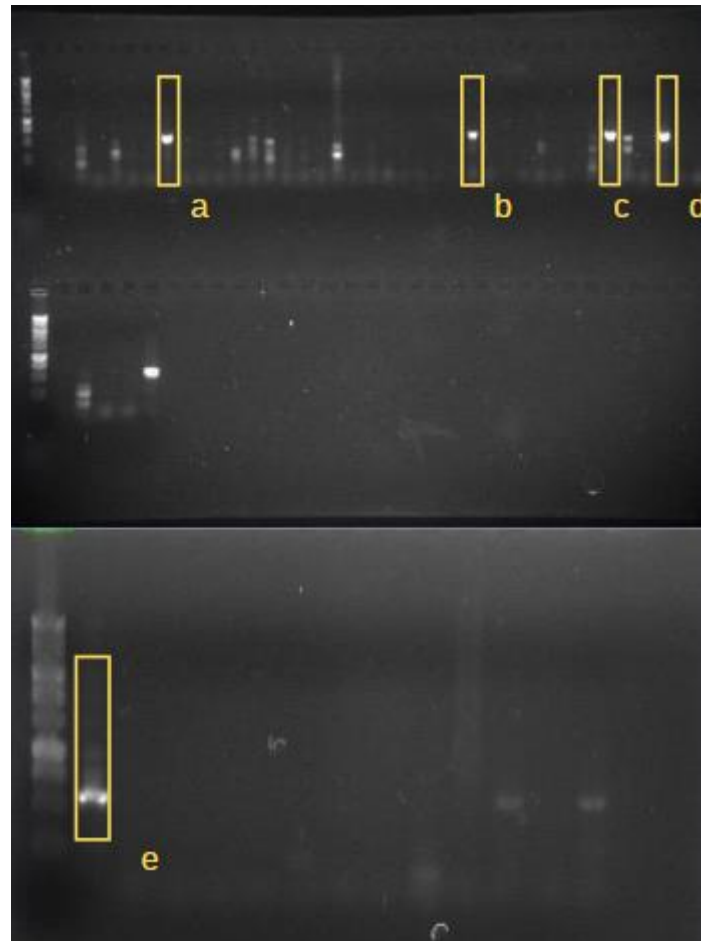
4.1.1 Conclusiones

- Se pudo confirmar la circulación de haemoparásitos en el área de estudio con 5 positivos totales, 3 para Bosque protector y vegetación Prosperina, 1 para la reserva de la finca Arbofino y un positivo externo a los puntos de muestreo. Este patrón sugiere una mayor parasitosis en el habitar urbano con presencia en el hábitat conservado. Por otra parte, la baja parasitemia en *Vireo chivi* de Bosque protector y vegetación Prosperina es compatible con una infección subclínica, lo que indica potencial reservorio y mantenimiento del parásito en los ecosistemas.
- A nivel descriptivo, los resultados sostienen la hipótesis de que existe una mayor transmisión en ambientes urbanos, mientras que el positivo para Arbofino evidencia que el riesgo de transmisión a lo largo del tiempo está presente.
- Los métodos implementados para la captura, manejo, toma de sangre y análisis de las mismas, permitieron tener una calidad óptima de las muestras para su análisis en laboratorio, lo que respalda la idoneidad del protocolo usado en campo y laboratorio.

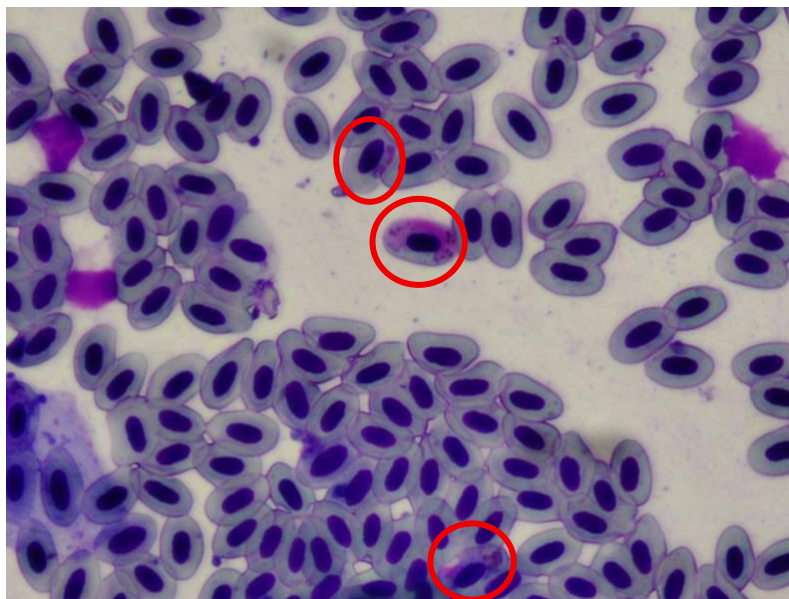
4.1.2 Recomendaciones

- Ampliar el tamaño muestral por sitio es muy importante para estudios futuros para robustecerá la comparación de hábitats, la obtención de más muestras por sitios es imprescindible para un análisis eficiente y solido de los datos
- La secuenciación de las muestras puede ser importante para conocer linajes y entender la distribución y fuentes de infección relacionados a cada punto de muestreo.
- Para Bosque Protector Cerro Blanco, es necesario aumentar el esfuerzo de muestreo con más días y a su vez más redes para maximizar la captura de aves para un mejor análisis de muestras ya que el resultado actual podría mostrar un falso negativo para este hábitat.

Apéndices



Anexo 1 Resultado de las PCR realizadas donde se observan los 5 positivos infectados con Haemoparásitos, donde a, c y e pertenecen a Bosque protector y vegetación Prosperina; b pertenece a Arbofino y d perteneciente a la muestra externa a los sitios de muestreo.



Anexo 2 Frotis sanguíneo de Vireo chivi donde se observa eritrocito infectado por *Haemoproteus vireonis*

Referencias

- Erkyihun, G. A., & Alemayehu, M. B. (2022). One Health Approach for the Control of Zoonotic Diseases. *Zoonoses*, 2(37). <https://doi.org/10.15212/ZOONOSSES-2022-0037>
- Svensson-Coelho, M., Blake, J. G., Loiselle, B. A., Penrose, A. S., Parker, P. G., & Ricklefs, R. E. (2013). Diversity, Prevalence, and Host Specificity of Avian Plasmodium and Haemoproteus in a Western Amazon Assemblage. *Ornithological Monographs*, (76), 1-47. <https://doi.org/10.1525/om.2013.76.1.1>
- Esperon-Rodriguez, M., Rymer, P. D., Power, S. A., Barton, D. N., Cariñanos, P., Dobbs, C., ... & Tjoelker, M. G. (2022). Assessing climate risk to support urban forests in a changing climate. *Plants, People, Planet*, 4(3), 201–213. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10240>
- Kefifa, A., & Benabdeli, K. (2014). Contribution to the Study of the Structure of the Main Ligneous Species in the Preservation of Forest Spaces in the Monts of Saida and Dhaya (Algerian West). *Ecologia Balkanica*, 6(1), 11-18.
- Mekonen, S. (2017). Birds as Biodiversity and Environmental Indicator. *Journal of Natural Sciences Research Wwww.iiste.org ISSN*, 7(21).

Farhab, M., Hussain, R., Aleem, M. T., Luqman, Z., & Sarwar, N. (2021). Wildlife Diseases Of Tropics And Sub Tropics. *Veterinary Pathobiology & Public Health*, 554.

<https://doi.org/10.47278/book.vpph/2021.046>

Rodenhouse, N. L. (1992). Potential Effects of Climatic Change on a Neotropical Migrant Landbird. *Conservation Biology*, 6(2), 263–272. <http://www.jstor.org/stable/2386248>

Xu, Y., Poosakkannu, A., Suominen, K. M., Laine, V. N., Lilley, T. M., Pulliainen, A. T., & Lehtikoinen, A. (2023). Continental-scale climatic gradients of pathogenic microbial taxa in birds and bats. *Ecography*, 2023(12). <https://doi.org/10.1111/ecog.06783>

El-Sayed, A., & Kamel, M. (2020). Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(18), 22336–22352. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08896-w>

Hemert, C. V., Pearce, J. M., & Handel, C. M. (2014). Wildlife health in a rapidly changing North: focus on avian disease. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(10), 548–556. <https://doi.org/10.1890/130291>

Schumm, Y. R., Bakaloudis, D., Barboutis, C., Cecere, J. G., Eraud, C., Fischer, D., Hering, J., Hillerich, K., Lormée, H., Mader, V., Masello, J. F., Metzger, B., Rocha, G., Spina, F., & Quillfeldt, P. (2021). Prevalence and genetic diversity of avian haemosporidian parasites in wild bird species of the order Columbiformes. *Parasitology Research*, 120(4), 1405–1420. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07053-7>

Tesfahunegny, W., & Mulualem, G. (2017). Impact of Climatic Change on Avian Populations: Implication for Long Term Conservation in Wildlife Genetic Resources. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 5(1), 23-33. <https://doi.org/10.11648/j.bio.20170501.15>

Esperon-Rodriguez, M., Rymer, P. D., Power, S. A., Barton, D. N., Cariñanos, P., Dobbs, C., Eleuterio, A. A., Escobedo, F. J., Hauer, R., Hermy, M., Jahani, A., Onyekwelu, J. C.,

Östberg, J., Pataki, D., Randrup, T. B., Rasmussen, T., Roman, L. A., Russo, A., Shackleton, C., & Tjoelker, M. G. (2022). Assessing climate risk to support urban forests in a changing climate. *Plants, People, Planet*, 4(3), 201–213. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10240>

Watson, J. E. M., Watson, J. E. M., Evans, T., Venter, O., Williams, B., Williams, B., Tulloch, A. I. T., Tulloch, A. I. T., Stewart, C. L., Thompson, I. D., Ray, J. C., Murray, K. A., Salazar, A., McAlpine, C., Potapov, P., Walston, J., Robinson, J. G., Painter, M., Wilkie, D., ... Lindenmayer, D. B. (2018). The exceptional value of intact forest ecosystems. *Nature Ecology and Evolution*, 2(4), 599–610. <https://doi.org/10.1038/S41559-018-0490-X>

LaDeau, S. L., Allan, B. F., Leisnham, P. T., & Levy, M. Z. (2015). The ecological foundations of transmission potential and vector-borne disease in urban landscapes. *Functional Ecology*, 29(7), 889–901. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12487>

Valkiūnas, G., & Iezhova, T. A. (2018). Keys to the avian malaria parasites. *Malaria Journal*, 17, 212. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2359-5>

Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. I. (2017). Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(6), a025486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025486>

Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrino, L. (2018). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 248. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>

LaPointe, D. A., Atkinson, C. T., & Samuel, M. D. (2012). Ecology and conservation biology of avian malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1249(1), 211–226. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06431.x>

Sargent, K., Mollard, J., Henley, S. F., & Bollasina, M. A. (2022). Predicting Transmission Suitability of Mosquito-Borne Diseases under Climate Change to Underpin

Decision Making. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13656). <https://doi.org/10.3390/ijerph192013656>

Svensson-Coelho, M., Blake, J. G., Loisele, B. A., Penrose, A. S., Parker, P. G., & Ricklefs, R. E. (2013). Diversity, prevalence and host specificity of avian plasmodium and haemoproteus in a western Amazon assemblage. *Ornithological Monographs*, 76, 1–47.

Pibaque, P., & Piedrahita, P. (2022). First Report of Blood Parasites in Black-capped Sparrow (*Arremon abeillei*) from Neotropical Dry Deciduous Forest. *Journal of Wildlife Diseases*, 58(4), 892–896. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-21-00200>

Valkiūnas, G., & Iezhova, T. A. (2022). Keys to the avian Haemoproteus parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). *Malaria Journal*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04235-1>

Pérez-Rodríguez, A., de la Puente, J., Onrubia, A., & Pérez-Tris, J. (2013). Molecular characterization of haemosporidian parasites from kites of the genus *Milvus* (Aves: Accipitridae). *International Journal for Parasitology*, 43(5–6), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.12.007>

McCoy, K. D., Dietrich, M., Jaeger, A., Wilkinson, D. A., Bastien, M., Lagadec, E., Boulinier, T., Pascalis, H., Tortosa, P., Le Corre, M., Dellagi, K., & Lebarbenchon, C. (2016). The role of seabirds of the Iles Eparses as reservoirs and disseminators of parasites and pathogens. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 72, 98–109. <https://doi.org/10.1016/J.ACTAO.2015.12.013>

Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Loiseau, C., & Sehgal, R. N. M. (2009). Nested Cytochrome B Polymerase Chain Reaction Diagnostics Detect Sporozoites of Hemosporidian Parasites in Peripheral Blood of Naturally Infected Birds. *Journal of Parasitology*, 95(6), 1512–1515. <https://doi.org/10.1645/GE-2105.1>

