

**Hemosporidios aviares (Haemosporida:  
*Plasmodium* y *Haemoproteus*) en el  
departamento de Arauca, región de la  
Orinoquía colombiana**

**Johnathan Alvarez Londoño**

Universidad de Caldas  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento Biología  
Manizales, Colombia  
2021

# **Hemosporidios aviares (*Haemosporida*: *Plasmodium* y *Haemoproteus*) en el departamento de Arauca, región de la Orinoquía colombiana**

Johnathan Alvarez Londoño

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Biólogo**

Directores

Ph.D Gabriel Jaime Castaño Villa

Ph.D Fredy Arvey Rivera Páez

Codirectora:

M.Sc.(c) Marelid Cardona Romero

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Genética, Biodiversidad y Manejo de Ecosistemas (GEBIOME)

Línea de Investigación:

Caracterización de la diversidad genética de especies

Universidad de Caldas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento Biología

Manizales, Colombia

2021

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación Minciencias (código: 112777758193, contrato 858 de 2017). Agradecimientos a la Universidad de Caldas, Universidad Católica de Manizales, Unidad Administrativa Especial de Salud de Arauca, Universidad Nacional sede Orinoquía, a los grupo de investigación GERPH - Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, GEBIOME y Ecosistemas Tropicales (Universidad de Caldas), y a los propietarios de las localidades en las cuales se realizó el estudio.

## Resumen

Los hemosporidios aviares de los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium* son un grupo diverso y ampliamente distribuido de parásitos sanguíneos transmitidos por vectores. Estos parásitos tienen efectos negativos en la supervivencia de las aves al influir en varios aspectos de su ciclo de vida, ocasionando diferentes patologías e incluso la muerte. Colombia presenta una gran diversidad de aves, sin embargo, son pocos los estudios sobre las asociaciones presentes entre hemosporidios y aves silvestres. En este contexto, el objetivo del estudio fue determinar las especies y linajes de hemosporidios de aves silvestres presentes en el departamento de Arauca, región de la Orinoquía Colombiana. En ocho localidades de tres municipios, se capturaron y tomaron muestras de sangre de aves, identificando los hemosporidios presentes mediante análisis morfológicos y moleculares del gen mitocondrial citocromo *b*. Se analizaron muestras de sangre de 233 aves pertenecientes a 84 especies, con una prevalencia para hemosporidios del 9,0% ( $n = 21$ ), 15 especies de aves residentes y migratorias fueron positivas para *Plasmodium* o *Haemoproteus*. Se identificaron 15 linajes de hemosporidios, de los cuales seis son reportados por primera vez en la base de datos del MalAvi. Estos nuevos linajes son reportados en cinco aves residentes y un ave migratoria boreal (*Parkesia noveboracensis*). Este estudio es el primero realizado en el departamento de Arauca y contribuye al conocimiento de los linajes de hemosporidios y su interacción con aves silvestres en la región de la Orinoquía colombiana y el país.

**Palabras clave:** Aves migratorias, *Haemoproteus*, infección abortiva, malaria aviar, nuevos linajes y *Plasmodium*.

## Abstract

Avian hemosporidia of the genera *Haemoproteus* and *Plasmodium* are a diverse and widely distributed group of vector-borne blood parasites. These parasites have negative effects on the survival of birds by influencing various aspects of their life cycle, causing different pathologies and even death. Colombia presents a great diversity of birds, however, there are few studies on the associations present between hemosporidia and wild birds. In this context, the objective of the study was to determine the species and lineages of hemosporidia of wild birds present in the department of Arauca, region of the Colombian Orinoquía. In eight localities of three municipalities, blood samples from birds were captured and taken, identifying the hemosporidia present through morphological and molecular analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. Blood samples from 233 birds belonging to 84 species were analyzed, with a prevalence for hemosporidia of 9.0% (n = 21), 15 species of resident and migratory birds were positive for *Plasmodium* or *Haemoproteus*. Fifteen lineages of hemosporidia were identified, of which six are reported for the first time in the MalAvi database. These new lineages are reported in five resident birds and one boreal migratory bird (*Parkesia noveboracensis*). This study is the first carried out in the department of Arauca and contributes to the knowledge of the hemosporidium lineages and their interaction with wild birds in the Colombian Orinoquía region and the country.

**Keywords:** Migratory birds, *Haemoproteus*, abortive infection, avian malaria, new lineages and *Plasmodium*.

## Tabla de contenido

1. Introducción.....	7
2. Materiales y Métodos .....	9
2.1. Área de estudio.....	9
2.2. Toma y procesamiento de muestras .....	10
2.3. Análisis morfológico .....	10
2.4. Análisis molecular.....	11
3. Resultados.....	12
4. Discusión .....	19
5. Conclusiones.....	22
6. Recomendaciones .....	22
Referencias bibliográficas.....	23

## Lista de tablas

Tabla 1.....	13
--------------	----

## Lista de figuras

Figura 1.....	13
Figura 2.....	15
Figura 3.....	17
Figura 4.....	18
Figura 5.....	21

# 1. Introducción

A escala global, el parasitismo es una de las formas de vida más exitosas que existe con más de 31000 especies de protozoarios parásitos reportados, y se estima que gran parte de esta diversidad se encuentra aún sin investigar (Matta & Rodríguez, 2001). Los parásitos hemosporidios son miembros del filo Apicomplexa, con ciclos de vida complejos y similares, que utilizan dípteros para infectar una gran variedad de hospederos vertebrados como mamíferos, reptiles y aves (Ricklefs & Fallon, 2002; Valkiūnas, 2004). Los hemosporidios aviares son un grupo ampliamente diverso, cosmopolita y común en algunas especies de aves (Atkinson & Van Riper, 1991; Valkiūnas, 2004). Los hemosporidios son transmitidos a las aves por la picadura de vectores como mosquitos y moscas de las familias Culicidae, Ceratopogonidae y Simuliidae (Santiago-Alarcón et al., 2012). Entre los hemosporidios que infectan aves se encuentran los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, que incluyen el agente causal de la malaria aviar (*Plasmodium* spp.) (Valkiūnas, 2004; Fecchio et al., 2017). Existen reportes de que los hemosporidios aviares tienen efectos negativos en el éxito reproductivo, la condición física e incluso pueden llevar a la muerte del hospedero (Olias et al., 2011; Shurulinkov et al., 2012; Isaksson et al., 2013).

El ciclo de los hemosporidios comprende un proceso sexual que tiene lugar en los vectores (hospederos definitivos) y un proceso asexual en los hospederos aviares (hospedero intermediario) (Valkiūnas et al., 2004). Durante el desarrollo de los hemosporidios, estos cambian de hospederos, formas de reproducción y etapas de desarrollo, por lo que necesitan de hospederos competentes para completar su ciclo (Valkiūnas et al., 2004). Sin embargo, los hemosporidios aviares pueden empezar una infección en hospederos no competentes que luego se aborta (infección abortiva), ya que se produce el desarrollo inicial del parásito en tejidos, pero estos no pueden completar su ciclo de vida, por lo que no aparecen formas eritrocíticas en la sangre del ave (Valkiūnas & Iezhova, 2017). Aunque estas infecciones son callejones sin salida de la transmisión, pueden ser virulentas y letales en hospederos no competentes (Olias et al., 2011; Cannell et al., 2013; Valkiūnas & Iezhova, 2017). En este

sentido, las infecciones abortivas aviarias son importantes para comprender la dinámica de transmisión parásito – hospedero y posibles áreas de infección (Clark et al., 2014; Valkiūnas et al., 2014; Valkiūnas & Iezhova, 2017). Estas infecciones abortivas son difíciles de detectar usando por separado métodos microscópicos o moleculares (Valkiūnas et al., 2009; Ciloglu et al., 2016; Chagas et al., 2017), por lo que se requiere la combinación de ambos métodos para su diagnóstico (Ciloglu et al., 2020).

La investigación de hemosporidios aviarios ha experimentado un aumento notable desde la introducción de métodos moleculares para su identificación, revelando sistemas complejos de múltiples hospederos y parásitos que son difíciles de entender sin un buen conocimiento del rango de hospederos y distribución geográfica de los linajes del parásito (Bensch et al., 2004). Linajes de ADNmt de parásitos que difieren en tan solo un nucleótido en el gen citocromo *b* (*cyt b*), con frecuencia exhiben áreas de transmisión claramente diferentes y rangos de especies hospedadoras (Waldenström et al. 2002; Beadell et al. 2004; Reullier et al. 2006). Sin embargo, la distribución geográfica de los linajes de hemosporidios genéticamente distintos es aún poco conocida (Ricklefs & Fallon, 2002; Waldenström et al., 2002; Fallon et al., 2005).

La región neotropical se caracteriza por tener la mayor diversidad de organismos en el mundo (Benedikt et al., 2009). Colombia es un territorio excepcionalmente biodiverso que ocupa el primer lugar en diversidad de aves en el mundo (Corzo et al., 2017). En el país se han registrado 1954 especies de aves, entre las que se encuentran 140 especies de aves migratorias boreales y australes (Asociación Colombiana de Ornitología, 2020). A su vez, la región de la Orinoquía sustenta una gran diversidad de aves y es un sitio de paso o invernada durante el viaje migratorio de algunas especies de aves (Ocampo-Peñuela, 2010). En Colombia, los estudios para el diagnóstico de hemosporidios en aves silvestres han aumentado de forma considerable durante los últimos años, con la detección morfológica y molecular de hemosporidios en aves residentes y migratorias (Matta & Rodríguez, 2001; Basto et al., 2006; Rodríguez et al., 2009; Lotta et al., 2013; 2016; González et al., 2014; Pulgarín et al., 2019). Además, se han descrito nuevas especies de hemosporidios para el país, como *Plasmodium* (*Novyella*) *unalis* sp. nov., *Haemoproteus erythrogravidus* (Mantilla et al., 2013; 2016), *Haemoproteus macrovacuolatus* (Matta et al., 2014), y *Leucocytozoon pterotenuis* (Lotta et



al., 2015). Sin embargo, en el departamento de Arauca, una zona donde confluyen aves migratorias boreales y australes, no hay estudios sobre hemosporidios asociados a aves silvestres. El objetivo de la investigación fue identificar los hemosporidios asociados a aves silvestres en el departamento de Arauca, y contribuir al conocimiento de hemosporidios aviáres en Colombia.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Área de estudio

La región de la Orinoquia, conocida como los Llanos Orientales se ubica entre Venezuela y Colombia, en la cuenca del río Orinoco (Viloria de la Hoz, 2009). La Orinoquia alberga una gran cantidad de ecosistemas como sabanas, ríos, quebradas, palmares, morichales, lagunas, esteros, bosques riparios, entre otros (Buriticá-Mejía, 2016). En la región se presenta un régimen de lluvias unimodal con una época de lluvias de abril a noviembre y una época seca de noviembre a febrero (Buriticá-Mejía, 2016).

El departamento de Arauca (07°05'05.0"N 70°45'32.7"W) se localiza en el sector norte de la Orinoquia colombiana en el límite con Venezuela. Posee una superficie de 23818 km<sup>2</sup> que corresponde al 2,1% del territorio nacional y está conformado por siete municipios (Rangel-Ch et al., 2017). Arauca, se encuentra ubicado en dos subregiones fisionómicas de la Orinoquia, las subregiones del piedemonte llanero y de la sabana inundable (Rodríguez-Durán, 2019). La subregión del piedemonte llanero (municipios de Arauquita, Fortul, Saravena y Tame) se encuentra ubicada en las últimas estribaciones de la cordillera oriental de Colombia, con una elevación promedio de 335 m. s. n. m. y una temperatura media mensual de 26 °C (Rangel-Ch et al., 2017). El piedemonte está constituido por una vegetación de bosques semidecíduos, decíduos, sábanas y bosques de galería (Caro-Caro et al., 2014). Por otra parte, la subregión de la sabana inundable (municipios de Arauca, Cravo Norte y Puerto Rondón) se encuentra a una elevación promedio de 120 m. s. n. m. con una temperatura media mensual de 27 °C (Rangel-Ch et al., 2017). Esta subregión está compuesta

por zonas abiertas y humedales cubiertos de vegetación (Pinzón et al., 2017). La presente investigación se desarrolló en ambas subregiones de la Orinoquía en ocho localidades de los municipios de Arauca, Cravo Norte y Tame en noviembre y diciembre de 2018 y marzo, julio y agosto de 2019 (Figura 1). Detalles de cada localidad de estudio se registran en Cardona-Romero et al. (2020).

## **2.2. Toma y procesamiento de muestras**

Para la captura de las aves silvestres se instalaron ocho redes de niebla (12 x 2.5 m x 36 mm) en los sitios de muestreo y se operaron durante las 0600 h hasta las 1800 h con una intensidad de muestreo de 3348 horas red. Las aves capturadas se identificaron con las guías de campo de Hilty & Brown (1986) y Ayerbe-Quiñones (2018). Se determinó el estatus de residencia de las aves de acuerdo a Avendaño et al. (2017). La identificación taxonómica de las aves siguió la nomenclatura de Remsen et al. (2021). Se tomaron muestras de sangre periférica de las aves (~ 20 a 50 µl) por punción de la vena braquial y se realizaron inmediatamente frotis sanguíneos (al menos tres por ave). Los frotis se secaron al aire libre y se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos y se tiñeron en Giemsa al 5% durante 45 minutos (González et al., 2014). La sangre restante se guardó en tarjetas FTA (*Flinders Technology Associates*) y se almacenó a temperatura ambiente hasta los análisis moleculares. Esta investigación se realizó bajo el permiso marco otorgado a la Universidad de Caldas por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales de Colombia (ANLA) de acuerdo a la resolución 02497 de diciembre 31 de 2018 y aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Caldas de junio 2 de 2017.

## **2.3. Análisis morfológico**

Los extendidos sanguíneos se examinaron por microscopia de luz, por aproximadamente 100-150 campos bajo el objetivo de (40X) y posteriormente bajo el objetivo de (100X) (Valkiūnas et al., 2008a). La identificación morfológica de los parásitos se realizó siguiendo a Valkiūnas (2004) y Valkiūnas & Lezhova (2017). Las imágenes digitales fueron tomadas usando cámara digital Leica EC3 y procesadas con el software LAS EZ.

## 2.4. Análisis molecular

Se realizó extracción de ADN de las muestras de sangre utilizando el *Kit Wizard Genomic DNA Purification* de Promega, de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante. Para la detección de parásitos hemosporidios aviares se realizaron pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa b (*cyt b*). La PCR inicial se realizó utilizando los primers AE064/AE066 que amplifican un fragmento aproximado de 1109 pb, para los tres géneros del orden Haemosporida (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) (Pacheco et al., 2018). La segunda parte de la PCR se llevó a cabo sobre el amplicon de la PCR inicial, con los primers HaemF/HaemR2 que amplifican un fragmento de 525 pb de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*, y con los primers HaemFL/HaemR2L que amplifican un fragmento de 525 pb del género *Leucocytozoon* (Hellgren et al., 2004).

Todas las reacciones de PCR fueron acompañadas por controles negativos (dH<sub>2</sub>O) y controles positivos (muestra de *Haemoproteus columbae*, previamente confirmada por secuenciación y microscopía donada por el grupo GERPH, Grupo de Estudio Relación Parásito Hospedero, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá). Todos los productos de PCR se visualizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% usando tampón de corrida TBE 1X, coloreados con SYBR SAFE y visualizados en fotodocumentador UV. Los productos de PCR positivos fueron enviados a Macrogen (Corea del Sur) para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se limpiaron y editaron en el programa Geneious Prime versión 2020.0.5 (Drummond et al., 2009) y se alinearon con el programa MEGA X (Kumar et al., 2018). Las secuencias se compararon e identificaron con las secuencias públicas depositadas en las bases de datos de MalAvi (Bensch et al., 2009) y el GenBank. Las secuencias con uno o más nucleótidos diferentes de los linajes conocidos se consideraron nuevos linajes y se nombraron siguiendo la nomenclatura disponible en la base de datos del MalAvi (Bensch et al., 2004; 2009). Las relaciones filogenéticas entre los linajes de hemosporidios identificados en el estudio y los hemosporidios relacionados, se construyeron utilizando únicamente secuencias del gen *cyt b* de la base de datos del MalAvi que tenían identificación de morfoespecies mediante frotis de sangre (Bensch et al., 2009).

La reconstrucción filogenética se realizó utilizando inferencia Bayesiana. El mejor modelo de sustitución de acuerdo con el criterio de información de Akaike corregido fue seleccionado como *General Time Reversible* (GTR + I + G) usando jModeltest v2.1.6 (Darriba et al., 2012). El análisis bayesiano se realizó en MrBayes v3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), a través de CIPRES *Science Gateway* v3.3 (Miller et al., 2010). Dos simulaciones independientes de *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) se realizaron simultáneamente para 15 millones de generaciones con cuatro cadenas, muestreadas cada 100 generaciones. En total el 25% de los árboles se descartaron como periodos de *burn-in* y los árboles restantes se usaron para construir un árbol consenso de la regla de la mayoría del 50%. La filogenia se visualizó utilizando FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2006). Las secuencias obtenidas se depositaron en las bases de datos del MalAvi y el GenBank.

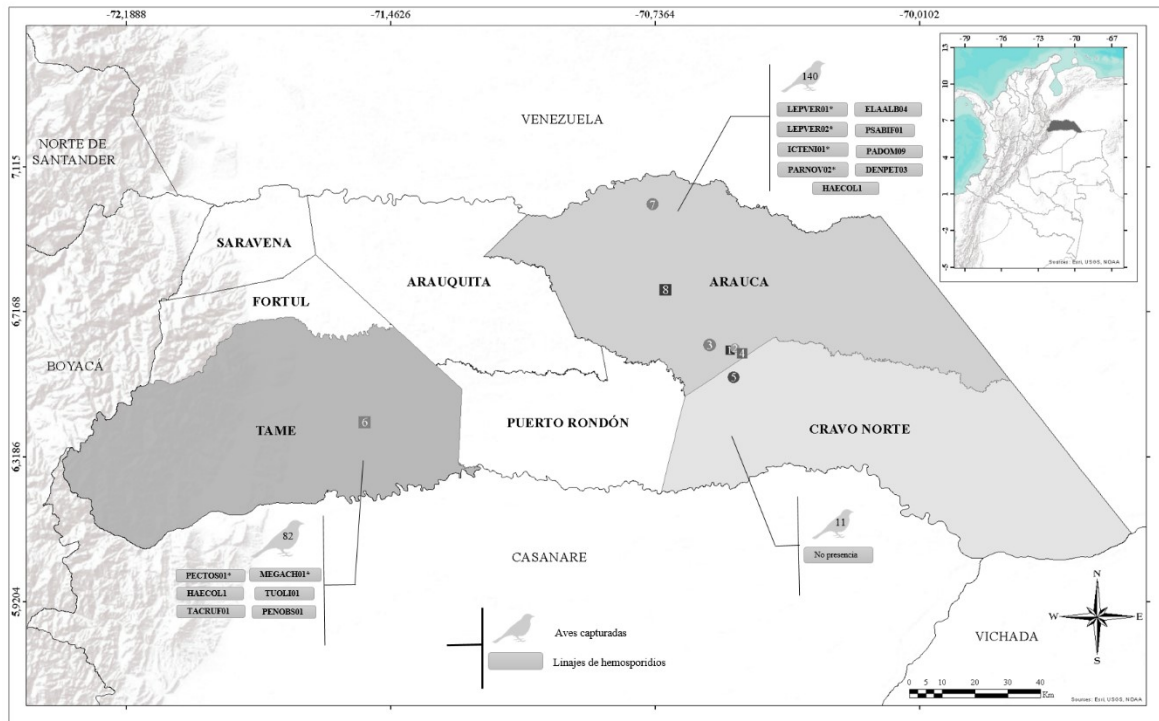
Finalmente se determinó la prevalencia por infección de hemsporidios en las aves como  $(\text{Número de individuos infectados} / \text{Número de individuos examinados}) \times 100$ .

### 3. Resultados

Se analizaron un total de 233 aves silvestres residentes ( $n = 212$ ) y migratorias boreales ( $n = 21$ ), pertenecientes a 86 especies (once órdenes y 26 familias), en ocho localidades de los municipios de Arauca, Cravo Norte y Tame (Figura 1). En total 21 aves de 18 especies (seis órdenes y once familias) fueron positivas para hemsporidios de los géneros *Haemoproteus* o *Plasmodium*, con una prevalencia del 9,0% (Tabla 1). No se encontraron aves positivas para hemsporidios del género *Leucocytozoon*. Los órdenes Passeriformes y Columbiformes presentaron las mayores prevalencias, 62% y 24% respectivamente. Las familias de aves parasitadas fueron: Cracidae, Columbidae, Psittacidae, Strigidae, Furnariidae, Vireonidae, Turdidae, Passerellidae, Icteridae, Parulidae y Thraupidae (Tabla 1). La familia Columbidae presentó el mayor número de individuos parasitados ( $n = 5$ ) (Tabla 1).

**Figura 1.** Departamento de Arauca – Colombia. Localidades muestreadas en los municipios de Arauca, Tame y Cravo Norte. 1. Las Plumas – Los Iguanitos, 2. Las Plumas – Finca El

Futuro – El Médano, 3. Las Plumas – Guayabital, 4. Las Plumas – Los Cunagueros, 5. El Deleite – El Deleite, 6. Santa Inés – La Porfía, 7. Km 9, Vía Arauca – Araucita – Bosque UNAL, 8. El Socorro – Finca Los Trompillos. El número de aves capturadas y los linajes de hemosporidios aviares detectados en el estudio, son mostrados por municipio.



**Tabla 1.** Hospederos aviares positivos para hemosporidios en el departamento de Arauca por diagnóstico de PCR. Las localidades corresponden a los números presentados en la figura 1. Los códigos de acceso del Genbank en negrilla corresponden a las secuencias obtenidas en este estudio.

Orden	Family	Host species	No. infected birds/no. examined birds (% prevalence)	Parasite species and lineages from MalAvi (% similarity)	[GenBank Accession] % similarity	Municipality/Locality
Galliformes	Cracidae	<i>Ortalis ruficauda</i>	1/1(100)	<i>Haemoproteus</i> sp. <b>ORTRUF01*</b> (100%)	<b>[MW899346]</b>	Tame/6
Columbiformes	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	2/5(40)	<i>Haemoproteus</i> sp. <b>LEPVER01*</b>	<b>[MW899336]</b>	Arauca/3

Orden	Family	Host species	No. infected birds/no. examined birds (% prevalence)	Parasite species and lineages from MalAvi (% similarity)	[GenBank Accession] % similarity	Municipality/Locality
				<i>Plasmodium</i> sp. <b>NYCNYC01</b>	[MK264403] 100%	Arauca/4
		<i>Leptotila rufaxilla</i>	1/2(50)	<i>Haemoproteus columbae</i> <b>HAECOL1</b> (100%)	[MN584889] 100%	Tame/6
		<i>Columbina minuta</i>	1/1(100)	<i>Haemoproteus columbae</i> <b>HAECOL1</b> (100%)	[MN065417] 100%	Arauca/4
		<i>Zenaida auriculata</i>	1/2(50)	<i>Haemoproteus columbae</i> <b>HAECOL1</b> (100%)	[MN584889] 100%	Arauca/2
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Forpus conspicillatus</i>	1/3(33.3)	IA <sup>a</sup>		Tame/6
Strigiformes	Strigidae	<i>Megascops choliba</i>	1/1(100)	<i>Plasmodium</i> sp. <b>MEGACH01*</b>	[MW899345]	Tame/6
Passeriformes	Furnariidae	<i>Phacellodomus rufifrons</i>	1/1(100)	IA <sup>b</sup>		Tame/6
	Vireonidae	<i>Vireo flavoviridis</i> <sup>+</sup>	1/1(100)	<i>Plasmodium</i> sp. <b>PSABIF01</b> (100%)	[MN459428] 100%	Arauca/3
	Turdidae	<i>Turdus nudigenis</i>	1/2(50)	<i>Plasmodium cathemerium</i> <b>PADOM09</b> (100%)	[MT013360] 100%	Arauca/3
		<i>Turdus leucomelas</i>	1/4(25)	<i>Plasmodium</i> sp. <b>TUOLI01</b> (100%)	[KX130088] 100%	Tame/6
	Passerellidae	<i>Arremon taciturnus</i>	2/4(50)	<i>Plasmodium</i> sp. <b>PECTOS01*</b>	[MW899343]	Tame/6
				IA <sup>a</sup>		Tame/6
		<i>Icterus chrysater</i>	1/2(50)	<i>Plasmodium</i> sp. <b>TACRUF01</b> (100%)	[MN458619] 100%	Tame/6
	Icteridae	<i>Icterus nigrogularis</i>	1/2(50)	<i>Plasmodium</i> sp. <b>VOLJA03</b>	[MN459428] 100%	Arauca/4
		<i>Gymnomystax mexicanus</i>	1/1(100)	<i>Plasmodium</i> sp. <b>ELAALB04</b> (100%)	[MK695481] 100%	Arauca/1
	Parulidae	<i>Setophaga ruticilla</i> <sup>+</sup>	1/3(33.3)	IA <sup>a</sup>		Tame/6
		<i>Parkesia noveboracensis</i> <sup>+</sup>	1/1(100)	<i>Haemoproteus</i> sp. <b>PARNOV02*</b>	[MW899334]	Arauca/1

Orden	Family	Host species	No. infected birds/no. examined birds (% prevalence)	Parasite species and lineages from MalAvi (% similarity)	[GenBank Accession] % similarity	Municipality/Locality
	Thraupidae	<i>Saltator coerulescens</i>	2/2(100)	<i>Plasmodium nucleophilum</i> <b>DENPET03</b> (100%)	[KX159489] 100%	Arauca/3
				IA <sup>a</sup>		Arauca/1

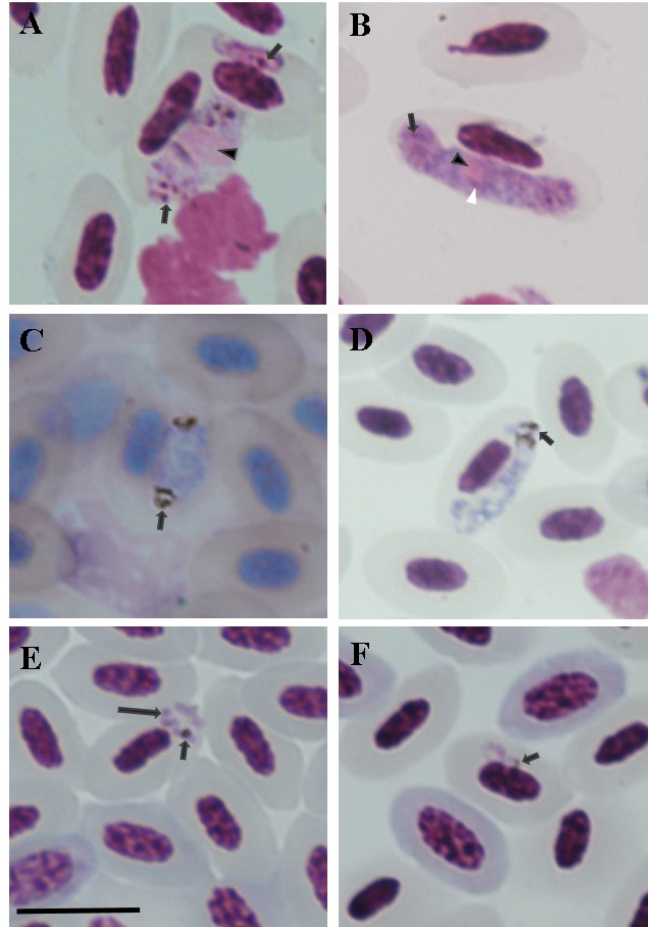
\*Nuevos linajes de hemosporidios reportados en el estudio. †Aves migratorias boreales. IA: muestras positivas con infección abortiva.

<sup>a</sup> secuencias que mostraron un 100% de similitud con la especie *Haemoproteus columbae* del GenBank

<sup>b</sup> secuencia que mostró 100% de similitud con la especie *Plasmodium falciparum* del GenBank

En los extendidos sanguíneos solo se observaron formas parasíticas en sangre para 16 de las 21 aves positivas por PCR. La identificación morfológica de los hemosporidios encontrados solo se determinó hasta nivel de género debido a las bajas intensidades de infección (Figura 2).

**Figura 2.** Hemosporidios encontrados en el estudio, (A y B) microgametocito y macrogametocito de *Haemoproteus* sp. (C y D) gametocitos de *Plasmodium* sp. (E) meronte inmaduro de *Plasmodium* sp. (F) trofozoito de *Plasmodium* sp. *Flecha corta* pigmento de hemozoina. *Punta de flecha negra* núcleo del parásito. *Flecha larga* merozoito. *Punta de flecha blanca* nucléolo del parásito. Barra de escala = 10 µm.

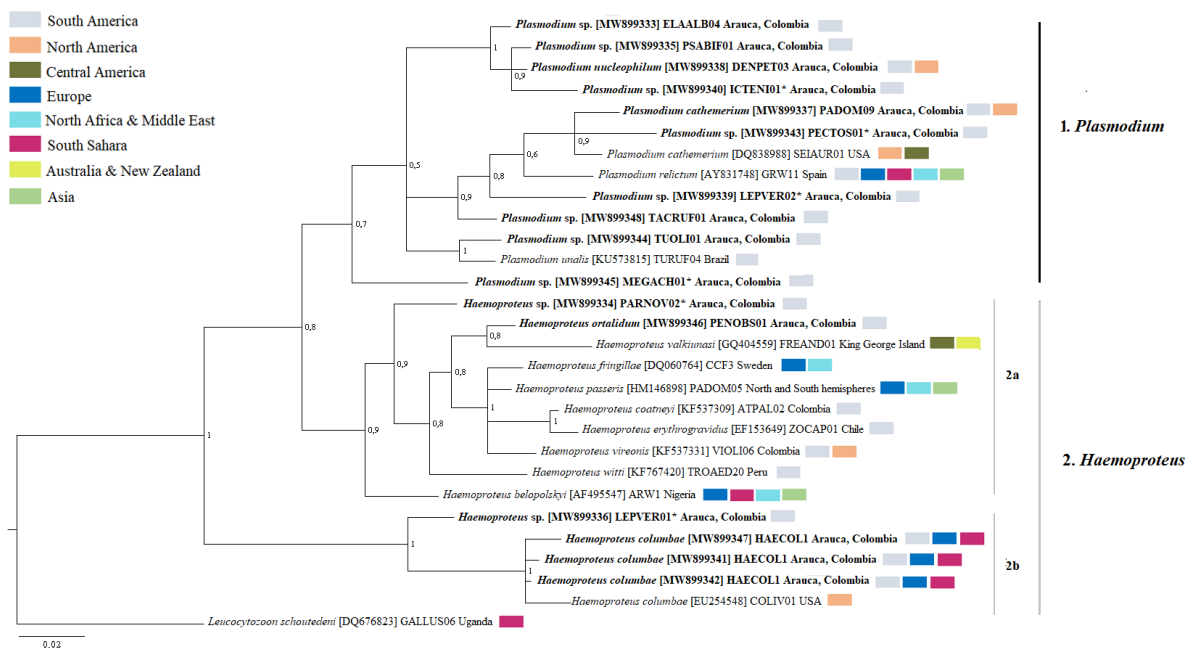


Un total de diez y nueve especies de aves presentaron positividad para *Plasmodium* o *Haemoproteus*, con prevalencias de 4,3% y 3,9% respectivamente, únicamente un individuo de la especie *Leptotila verreauxi*, fue positivo para *Plasmodium* y *Haemoproteus* (Tabla 1). En total se determinaron 14 linajes de hemosporidios presentes en las aves parasitadas. Estas aves fueron capturadas en bosque inundable, bosque de galería, médano y área agrícola en los municipios de Arauca y Tame (Tabla 1). No se encontraron muestras positivas de hemosporidios en aves capturadas en bosque inundable del municipio de Cravo Norte. Se encontraron ocho linajes previamente reportados en la base de datos del MalAvi y seis linajes son nuevos reportes, de los cuales cinco linajes LEPVER01, LEPVER02, MEGACH01, PECTOS01 y ICTENI01 se determinaron en aves residentes (*L. verreauxi*, *Megascops choliba*, *Arremon taciturnus* y *Icterus nigrogularis*) y el linaje PARNOV02 en un ave migratoria boreal (*Parkesia noveboracensis*). La reconstrucción filogenética de los linajes de hemosporidios aviáres se agruparon con fuertes soportes, indicados con probabilidades



posteriores entre 0,5 y 1,0. Se formaron dos clados principales que representan los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* (Figura 3). Adicionalmente, la filogenia de *Haemoproteus* formó dos clados bien soportados separando claramente especies de los subgéneros *Parahaemoproteus* y *Haemoproteus* (Figura 3). Los códigos de acceso al GenBank obtenidos en el estudio son [MW899333 - MW899348] para el gen *cyt b*.

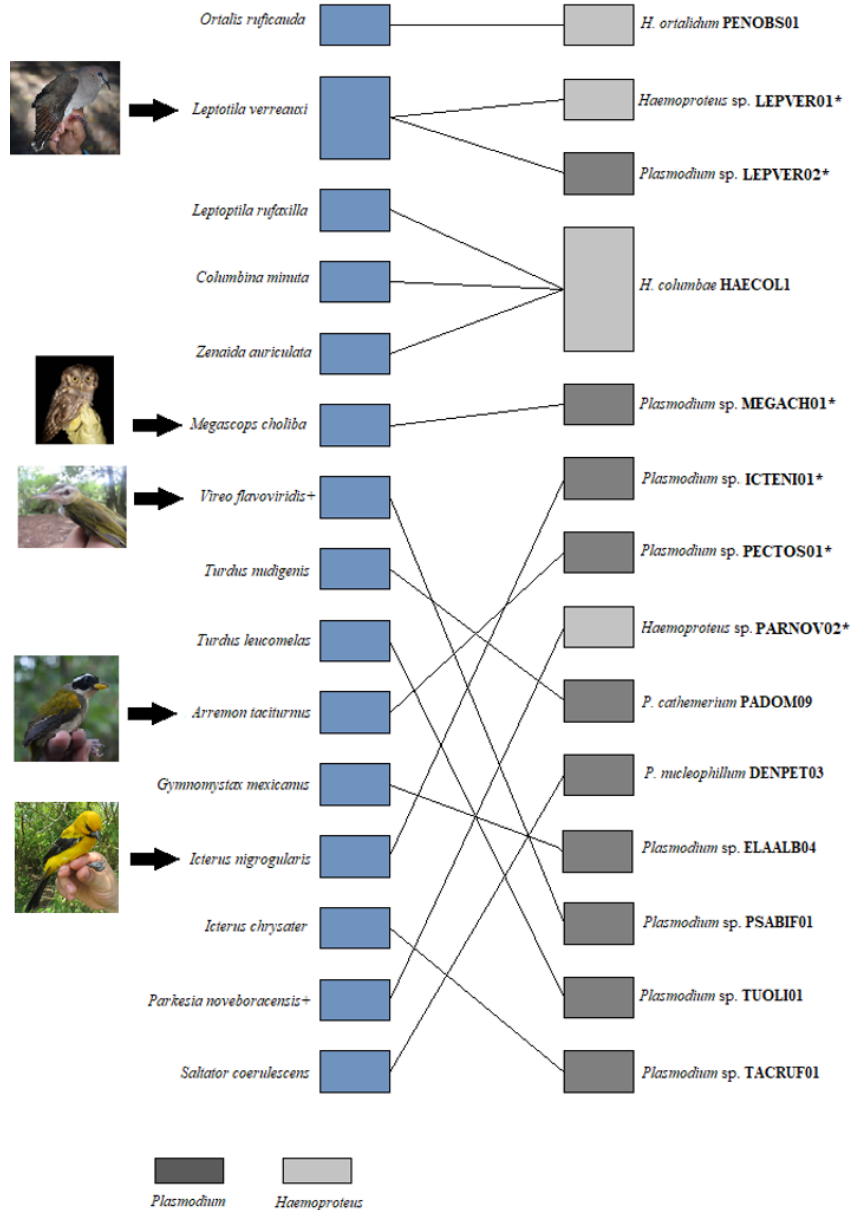
**Figura 3.** Filogenia Bayesiana de las secuencias parciales del gen citocromo *b* para los linajes de *Plasmodium* y *Haemoproteus* detectados en el estudio. En negrilla, las secuencias obtenidas en el estudio. Los números en los nodos soportan valores de probabilidades posteriores. 2a y 2b indican clados de especies de los subgéneros *Parahaemoproteus* y *Haemoproteus*, respectivamente. La secuencia de *Leucocytozoon schoutedeni* fue utilizada como grupo externo.



Se encontraron 16 asociaciones entre 15 especies de aves, y 14 linajes de hemosporidios (Figura 4). Se reportan nuevos linajes presentes en aves silvestres de los órdenes Columbiformes, Strigiformes y Passeriformes. El linaje HAECOL1 se identificó en tres especies de colúmbidos (*Leptotila rufaxilla*, *Columbina minuta* y *Zenaida auriculata*), a

diferencia de los demás linajes que solo se encontraron en una especie de ave (Tabla 1, Figura 4).

**Figura 4.** Asociaciones entre aves silvestres y linajes de hemosporidios en el departamento de Arauca - Colombia. \*Nuevos linajes detectados en el estudio. +Aves migratorias boreales.



Cinco muestras de aves de los órdenes Psittaciformes y Passeriformes se consideraron infecciones abortivas, de las cuales cuatro muestras de las especies *Forpus conspicillatus*, *Arremon taciturnus*, *Setophaga ruticilla* y *Saltator coerulescens*, mostraron un 100% de

similitud con la especie *H. columbae* (linaje HAECOL1) y una muestra de la especie *Phacellodomus rufifrons* mostró una similitud del 100% con la especie *Plasmodium falciparum* (Tabla 1).

## 4. Discusión

Este es el primer estudio sobre hemosporidios presentes en aves silvestres en el departamento de Arauca (Colombia). Se reportan hemosporidios de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* presentes en aves silvestres residentes y migratorias boreales en el departamento, lo que destaca a la Orinoquía colombiana como una importante región para la dispersión de hemosporidios aviares.

Se registran diez linajes de *Plasmodium* y cuatro linajes de *Haemoproteus*, cuatro de los cuales son reportados por primera vez para *Plasmodium* y dos para *Haemoproteus*. Todos los linajes reportados en este estudio tienen distribución en Suramérica, adicionalmente, los linajes DENPET03 y PADOM09 también se encuentran reportados para Norteamérica (Figura 3). El linaje HAECOL1 de *H. columbae* encontrado en este estudio, fue el linaje más común que tiene una amplia distribución geográfica con reportes en Suramérica, Europa y sur de Sahara (Bensch et al., 2009). Este linaje también presenta una alta prevalencia en regiones tropicales y subtropicales (Valkiūnas et al., 2004; Bensch et al., 2009). En Colombia, dicho linaje ha sido previamente reportado en *Columba livia* (Rock Dove, especie introducida) en la ciudad de Bogotá (González et al., 2015).

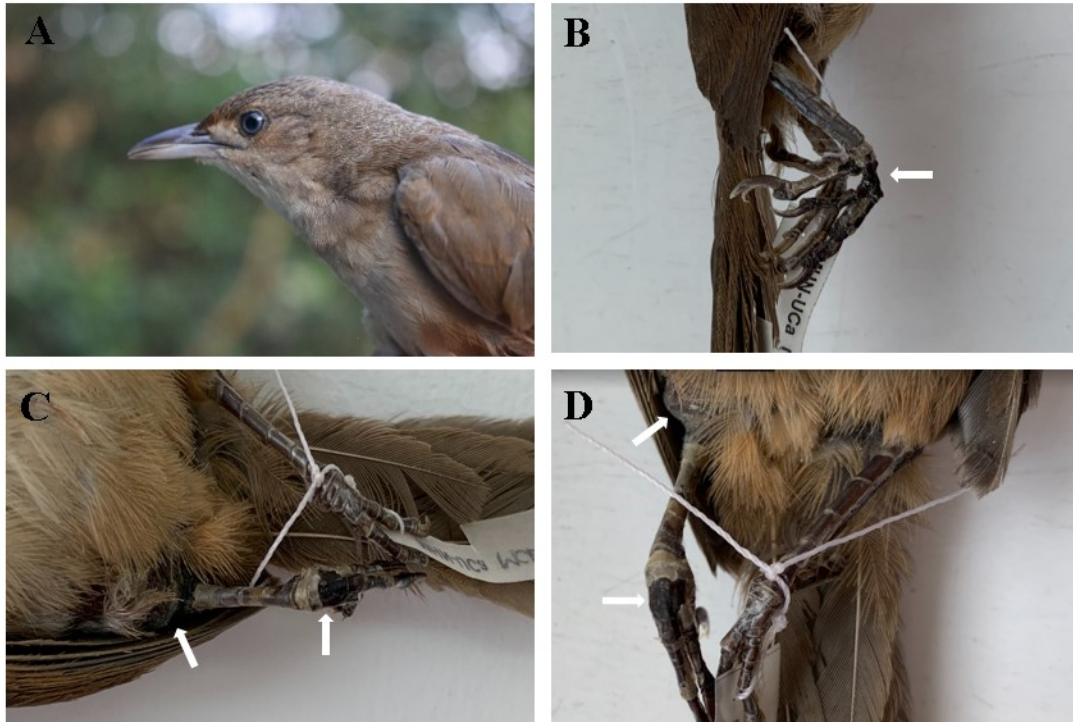
El linaje PARNOV02, fue por primera vez reportado en este estudio en el ave migratoria *P. noveboracensis*, especie proveniente de Norteamérica. Además, en otra especie migratoria boreal *Vireo flavoviridis* se encontró el linaje PSABIF01 reportado previamente solo para aves residentes de Suramérica (Bensch et al., 2009; Fecchio et al., 2017). Estas especies de aves migratorias boreales se reproducen en Canadá y Estados Unidos y pasan el invierno boreal en Suramérica (llegan hasta Perú y Bolivia). En particular este resultado sugiere que las aves migratorias podrían infectarse en su paso por Suramérica con linajes reportados en especies residentes (Fecchio et al., 2017). En general, nuestros resultados sugieren que las

aves migratorias pueden estar jugando un papel importante en la distribución geográfica de hemosporidios, no solo dentro sus localidades de reproducción en el hemisferio norte, sino también en los sitios de invernada en el trópico (Pulgarín et al. 2019).

En el orden Columbiformes, se encontraron los nuevos linajes LEPVER01 y LEPVER02 de los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium* respectivamente, en la especie *L. verreauxi*. Por otra parte, en el orden Strigiformes se encontró el nuevo linaje MEGACH01 en la especie *M. choliba*, este es el primer reporte de un linaje de *Plasmodium* sp. en esta especie de ave. Por último, en el orden Passeriformes se encontraron los nuevos linajes PECTOS01 y ICTENI01 del género *Plasmodium* y el linaje PARNOV02 perteneciente al género *Haemoproteus* (Figuras 3 y 4). Estos resultados amplían el conocimiento sobre los linajes de hemosporidios presentes en el país y en Suramérica.

Cuatro muestras de aves de los órdenes Psittaciformes y Passeriformes amplificaron para el linaje HAECOL1 de *H. columbae*, y teniendo en cuenta que este parásito solo se encuentra en aves del orden Columbiformes, y que no se observaron gametocitos en sangre, estas muestras se consideraron infecciones abortivas (Tabla 1) (Valkiūnas et al., 2013). Una muestra tomada de un ave de la especie *P. rufifrons* amplificó para *P. falciparum* (Tabla 1), uno de los parásitos causantes de la malaria humana (Hagner et al., 2007). Aunque este resultado se consideró una infección abortiva se requiere de más estudios y análisis para su confirmación. El individuo en el momento de su captura se encontró con necrosis y pérdida total de movimiento de la extremidad inferior derecha (Figura 5) y además mostró positividad para bacterias del género *Rickettsia* con el gen citrato sintasa (*gltA*), código de acceso al GenBank [MW314090]. El espécimen se depositó en la Colección de Aves del Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas con el código de colección MCR001. Estos resultados corroboran que las infecciones abortivas por hemosporidios pueden ser comunes en la vida silvestre y pueden persistir en el hospedero durante largo tiempo sin ser detectadas por microscopía, lo que ha llevado a subestimar dichos resultados en la investigación de hemosporidios en aves silvestres (Valkiūnas et al., 2013; Ciloglu et al., 2020).

**Figura 5.** Ejemplar de *Phacellodomus rufifrons* depositado en la Colección de Aves del Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas. (A) individuo inmaduro de *P. rufifrons*. (B) vista lateral del miembro inferior derecho con evidencia de muerte celular en el tejido (flecha). (C y D) vista ventral del miembro inferior derecho con evidencia de edema en el muslo derecho y muerte celular en el tejido (flechas).



Este estudio amplía el conocimiento de los linajes de hemosporidios aviáres presentes en la región de la Orinoquía colombiana y a su vez de las asociaciones entre hemosporidios y aves silvestres. La presencia de linajes reportados solo en Suramérica en aves migratorias boreales, evidencia la adquisición de hemosporidios en Suramérica, sin embargo, se requiere de estudios que demuestren que estos linajes se establecen en los sitios de reproducción de estas aves. Adicionalmente, los resultados de este estudio demuestran que las infecciones abortivas son comunes en las aves silvestres, por lo que no deben ser desatendidas debido a las implicaciones de salud que pueden tener dichas infecciones en sus hospederos. Finalmente, se reportan nuevos linajes de hemosporidios presentes en aves silvestres residentes y migratorias en el departamento de Arauca, contribuyendo al conocimiento en la dinámica de transmisión de hemosporidios aviáres.

## 5. Conclusiones

Este estudio amplía el conocimiento de linajes hemsporidios en la Orinoquía colombiana y es el primer estudio para el departamento de Arauca.

Estos resultados amplían el conocimiento de linajes hemsporidios en la Orinoquía colombiana y muestran un gran potencial para descubrir nuevas relaciones huésped-parásito en el departamento de Arauca. Se evidencia que las infecciones abortivas son comunes en la vida silvestre por lo que deben ser tenidas en cuenta dadas sus implicaciones en sus hospederos. La presencia de linajes reportados solo en Suramérica en aves migratorias boreales sugiere que las aves están siendo infectadas en su paso por Suramérica y resaltan la importancia de implementar estudios que puedan aclarar si estos linajes se establecen en los sitios de reproducción.

## 6. Recomendaciones

- Realizar estudios que permitan conocer las especies de vectores y hospederos involucrados en el ciclo completo de la transmisión de hemsporidios en el departamento de Arauca.
- Realizar estudios que incluyan variables ecológicas que influyen en las asociaciones hospedero-vector-patógeno.
- Conocer las implicaciones de las infecciones abortivas en estudios sobre conservación de especies.

## Referencias bibliográficas

[dataset] Asociación Colombiana de Ornitología., 2020. Lista de referencia de especies de aves de Colombia, Checklist, v2. <http://doi.org/10.15472/qhsz0p>.

Avendaño, J.E., Bohorquez, C.I., Rosselli, L., Arzuza-Buelvas, D., Estela, F.A., Cuervo, A.M., Stiles, F.G., Renjifo, L.M., 2017. Lista de chequeo de las aves de Colombia: una síntesis del estado del conocimiento desde Hilty & Brown (1986). *Ornitol. Colomb.* 2017, eA01-83 eA01-1.

Atkinson, C.T., Van Riper, C.I., 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: Loya J.E, Zuk M. (Eds.), *Bird-parasite interactions. Ecology, evolution and behavior*. Oxford University Press, New York, pp. 19-48.

Ayerbe-Quiñones, F., 2018. Guía Ilustrada de la Avifauna Colombiana A Field Guide to the Birds of Colombia. Puntoaparte Bookvertising, Bogotá D. C. Primera Edición.

Basto, N., Rodriguez, O., Marinkelle, C., Gutiérrez, R., Matta, N., 2006. Haematozoa In Birds From La Macarena National Natural Park (Colombia). *Caldasia*. 28, 371-377.

Benedikt, V., Barus, V., Capek, M., Havlicek, M., Literak, I., 2009. Blood parasites (*Haemoproteus* and microfilariae) in birds from the Caribbean slope of Costa Rica. *Acta Parasitol.* 54, 197-204. <https://doi.org/10.2478/s11686-009-0043-1>.

Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldenström, J., Hellgren, O., 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution*. 58, 1617-1621. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01742.x>.

Bensch, S., Hellgren, O., Pérez-Tris, J., 2009. MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Resour.* 9, 1353-1358. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x>.

Buriticá-Mejía, N., 2016. Sabanas Inundables De La Orinoquía Colombiana- Documento Resumen. In: Research Institute of Biological Resources Alexander von Humboldt. (Eds.), *Repositorio Institucional de Documentación Científica*. Bogotá.

Cannell, B.L., Krasnec, K.V., Campbell, K., Jones, H.I., Miller, R.D., Stephens, N., 2013. The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). *Vet. Parasitol.* 197, 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.025>.

Cardona-Romero, M., Martínez-Sánchez, E.T., Londoño, J.A., Tobón-Escobar, W.D., Ossa-López, P.A., Pérez-Cárdenas, J.E., Ramírez-Cháves, H.E., Blandón-Marín, G., Cuervo, L.A., Castaño-Villa, G.J., Rivera-Páez, F.A., 2020. *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest in ticks (Acari: Ixodidae) of wild birds in Arauca, Orinoquia region of Colombia. *International J. Parasitol. Parasites Wildl.* 13, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.09.001>.

Caro-Caro, C., Torres-Mora, M., Barajas-Barbosa, M., 2014. Ecosistemas estratégicos y disponibilidad de hábitat de la avifauna del Piedemonte Llanero (Colombia), como posible peligro aviar. *Luna Azul.* 39, 25-39. <https://doi.org/10.17151/luaz.2015.41.19>.

Chagas, C.R.F., Valkiūnas, G., de Oliveira Guimarães, L., Monteiro, E.F., Guida, F.J.V., Simões, R.F., Rodrigues, P.T., de Albuquerque Luna, E.J., Kirchgatter, K., 2017. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. *Malar. J.* 16, 83. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1729-8>.

Clark, N.J., Clegg, S.M., Lima, M.R., 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: haemosporida): new insights from molecular data. *Int. J. Parasitol.* 44, 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.004>.

Ciloglu, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Onder, Z., Dogan, Z., Inci, A., 2016. Investigation of avian haemosporidian parasites from raptor birds in Turkey, with molecular characterization and microscopic confirmation. *Folia Parasitol.* 63, 1. <https://doi.org/10.14411/fp.2016.023>.

Ciloglu, A., Ergen, A.G., Inci, A., Dik, B., Duzlu, O., Onder, Z., Yetismis, G., Bensch, S., Valkiūnas, G., Yildirim, A., 2020. Prevalence and genetic diversity of avian haemosporidian parasites at an intersection point of bird migration routes: Sultan Marshes National Park, Turkey. *Acta Trop.* 210, 105465. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105465>.

Corzo, G., Córdoba, D., Ciontescu, N., García, H. Isaacs, P., 2017. From Paramo Delimitation to Zoning and Monitoring the High Mountain. The case of the paramo complex



Guantivá-La Rusia. In Moreno, L.A., Andrade, G.I., Ruíz-Contreras, L.F. (Eds.), BIODIVERSITY 2016. Status and Trends of Colombian Continental Biodiversity. Research Institute of Biological Resources Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia, pp-106.

Darriba D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

Drummond, A.J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones, H.S., Thierer, T., Wilson, A., 2009. Geneious Prime version 2020.0.5. <https://www.geneious.com>.

Fallon, S.M., Bermingham, E., Ricklefs, R.E., 2005. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. *Am. Nat.* 165, 466-480. <https://doi.org/10.1086/428430>.

Fecchio, A., Pinheiro, R., Felix, G., Faria, I., Pinho, J., Lacorte, G.A., Braga, E.M., Farias, I.P., Aleixo, A., Tkach, V.V., Collins, M.D., Bell, J.A., Weckstein, J.D., 2017. Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. *Ecography.* 41, 505-515. <https://doi.org/10.1111/ecog.03058>.

González, A.D., Matta, N.E., Ellis, V.A., Miller, E.T., Ricklefs, R.E., Gutierrez, H.R., 2014. Mixed species flock, nest height, and elevation partially explain avian haemoparasite prevalence in Colombia. *PLoS One.* 9, e100695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100695>.

González, A.D., Lotta, I.A., García, L.F., Moncada, L.I., Matta, N.E., 2015. Avian haemosporidians from Neotropical highlands: evidence from morphological and molecular data. *Parasitol Int.* 64, 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.01.007>.

Hagner, S.C., Misof, B., Maier, W.A., Kampen, H., 2007. Bayesian analysis of new and old malaria parasite DNA sequence data demonstrates the need for more phylogenetic signal to clarify the descent of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* 101, 493-503. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0499-6>.

Hellgren, O., Waldenström, J., Bensch, S., 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90, 797-802. <https://doi.org/10.1645/ge-184r1>.

Hilty, S.L., Brown, W.L., 1986. *A Guide to the Birds of Colombia*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA, p. 996.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Lotta, I.A., Matta, N.E., Torres, R.D., Sandino, M.M., Moncada, L.I., 2013. *Leucocytozoon fringillinarum* and *Leucocytozoon dubreuilii* in *Turdus fuscater* from a Colombian páramo ecosystem. *J Parasitol.* 99, 359-362. <https://doi.org/10.1645/GE-3156.1>.

Lotta, I.A., Gonzalez, A.D., Pacheco, M.A., Escalante, A.A., Valkiūnas, G., Moncada, L.I., Matta, N.E., 2015. *Leucocytozoon pterotenuis* sp. nov. (Haemosporida, Leucocytozoidae): description of the morphologically unique species from the Grallariidae birds, with remarks on the distribution of *Leucocytozoon* parasites in the Neotropics. *Parasitol. Res.* 114, 1031-1044. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4269-y>.

Lotta, I.A., Pacheco, M.A., Escalante, A.A., González, A.D., Mantilla, J.S., Moncada, L.I., Adler, P.H., Matta, N.E., 2016. *Leucocytozoon* diversity and possible vectors in the Neotropical highlands of Colombia. *Protist.* 167, 185-204. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.02.002>.

Mantilla, J.S., González, A.D., Valkiūnas, G., Moncada, L.I., Matta, N.E., 2013. Description and molecular characterization of *Plasmodium (Novyella) unalis* sp. nov. from the Great Thrush (*Turdus fuscater*) in highland of Colombia. *Parasitol. Res.* 112, 4193-4204. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3611-0>.

Mantilla, J.S., González, A.D., Lotta, I.A., Moens, M., Pacheco, M.A., Escalante, A.A., Valkiūnas, G., Moncada, L.I., Pérez-Tris, J., Matta, N.E., 2016. *Haemoproteus erythrogravidus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae): description and molecular

characterization of a widespread blood parasite of birds in South America. *Acta Trop.* 159, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.025>.

Matta, N.E., Rodríguez, O.A., 2001. Hemoparásitos aviarios Avian Haematozoa. *Acta Biol. Colomb.* 6, 27-34. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63464/pdf>.

Matta, N.E., Pacheco, M.A., Escalante, A.A., Valkiūnas, G., Ayerbe-Quiñones, F., Acevedo-Cendales, L.D., 2014. Description and molecular characterization of *Haemoproteus macrovacuolatus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae), a morphologically unique blood parasite of black-bellied whistling duck (*Dendrocygna autumnalis*) from South America. *Parasitol. Res.* 113, 2991-3000. <https://doi-org.ezproxy.ucaldas.edu.co/10.1007/s00436-014-3961-2>

Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees," 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, USA, 2010, pp. 1-8, doi: 10.1109/GCE.2010.5676129.

Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010 "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans, LA, pp. 1-8.

Ocampo-Peñuela, N., 2010. El fenómeno de la migración en aves: una mirada desde la Orinoquia. *Orinoquía.* 14, 188-200. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v14n2/v14n2a09.pdf>.

Olias, P., Wegelin, M., Zenker, W., Freter, S., Gruber, A.D., Klopffleisch, R., 2011. Avian malaria deaths in parrots, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 950. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101618>.

Pacheco, M.A., Cepeda, A.S., Bernotienė, R., Lotta, I.A., Matta, N.E., Valkiūnas, G., Escalante, A.A., 2018. Primers targeting mitochondrial genes of avian haemosporidians: PCR detection and differential DNA amplification of parasites belonging to different genera. *International J. Parasitol.* 48, 657-670. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.003>.

Pinzón, C., Rangel-Ch, J., Minorta-Cely, O., Aymard, G., 2017. Riqueza y diversidad de las plantas con flores del área de los humedales y las sabanas inundables del departamento de Arauca, Colombia. *BioLlania.* 15, 470-532.

Pulgarín, R.P.C., Gómez, C., Bayly, N.J., Bensch, S., FitzGerald, A.M., Starkloff, N., Cadena, C.D., 2019. Migratory birds as vehicles for parasite dispersal? Infection by avian haemosporidians over the year and throughout the range of a long-distance migrant. *J. Biogeogr.* 46, 83-96. <https://doi.org/10.1111/jbi.13453>.

Rangel-Ch, J., Gopar-Merino, L., Minorta-Cely, V., 2017. Caracterización climática de las sabanas inundables y los humedales de Arauca, Colombia. *BioLlania.* 15, 357-409.

Rambaut, A., 2013. FigTree: tree figure drawing tool, version 1.3.1. In: Institute of Evolutionary Biology, U.o.E. (Ed.), <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

[dataset] Remsen Jr., J.V., Areta, J.I., Bonaccorso, E., Claramunt, S., Jaramillo, A., Pacheco, J.F., Robbins, M.B., Stiles, F.G., Stotz, D.F., Zimmer, J.K., 2020. A Classification of the Bird Species of South America. American Ornithological Society. Version [19 January 2021]. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.htm>.

Ricklefs, R.E., Fallon, S.M., 2002. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. Royal Soc.* 269, 885-892. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1940>.

Rodriguez, O., Moya, H., Matta, N., 2009. Avian blood parasites in the National Natural Park Chingaza: High Andes of Colombia. *Hornero.* 24, 1-6. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0073-34072009000100001](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0073-34072009000100001).

Rodríguez-Durán, A., 2019. Identificación y caracterización de garrapatas presentes en bovinos de las dos subregiones del departamento de Arauca, Colombia: Implicaciones como vector. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.*

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *BMC Bioinform.* 19, 1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.

Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., Schaefer, H.M., 2012. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biol. Rev.* 87, 928-964. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x>.

Valkiūnas, G., 2004. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC press, Boca Raton, London, New York and Washington, D.C.

Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R.N.M., Bensch, S., 2008a. A Comparative Analysis of Microscopy and PCR-Based Detection Methods for Blood Parasites. *J. Parasitol.* 94, 1395-1401. <https://doi.org/10.1645/ge-1570.1>.

Valkiūnas, G., Atkinson, C.T., Bensch, S., Sehgal, R.N., Ricklefs, R.E., 2008b. Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number? *Trends Parasitol.* 24, 247-248. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.03.004>.

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. *J. Parasitol.* 95, 1512-1515. <https://doi.org/10.1645/GE-2105.1>.

Valkiūnas, G., Kazlauskienė, R., Bernotienė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T.A., 2013. Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitol Res.* 112, 2159-2169. <https://doi.org/doi:10.1007/s00436-013-3375-6>.

Valkiūnas, G., Palinauskas, V., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Dimitrov, D., Bernotienė, R., Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Iezhova, T.A., 2014. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. *Parasitol. Res.* 113, 2251-2263. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3880-2>.

Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., 2017. Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. *Malar. J.* 16, 101. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1746-7>.

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

Viloria de la Hoz, J., 2009. Geografía económica de la Orinoquia. Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional y Urbana; No. 113. <https://doi.org/10.32468/dtseru.113>.

Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., Ottosson, U., 2002. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecol.* 11, 1545-1554. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01523.x>.