



DETECCIÓN POR PCR DE *Haemoproteus archilochus* EN *Amazilia tzacatl* (Trochilidae) EN COLOMBIA.

PCR detection of *Haemoproteus archilochus* in Rufous-tailed Hummingbird *Amazilia tzacatl* (Trochilidae) in Colombia.

Angie Nurien DUARTE-MORENO¹, Daniela VILLAMIZAR-ESCALANTE², Fernando RONDÓN-GONZÁLEZ¹

¹ Grupo de Investigación en Microbiología y Genética, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

² Grupo de Estudios en Biodiversidad, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

* **For correspondence:** ferongon@uis.edu.co

Received: 15th July 2020. **Returned for revision:** 13th November 2020. **Accepted:** 09th February 2021.

Associate Editor: Diego Santiago Alarcón

Citation/ citar este artículo como: Duarte-Moreno, A. N., Villamizar-Escalante, D., y Rondón-González, F. (2022). Detección por PCR de *Haemoproteus archilochus* en *Amazilia tzacatl* (Trochilidae) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 140-143. <https://doi.org/10.15446/abc.v27n1.89162>

RESUMEN

La infección causada por haemosporidios en colibríes no ha sido estudiada en zonas agroforestales o urbanas de la vertiente occidental de la Cordillera Oriental de los Andes en el departamento de Santander, pese a existir evidencia de esta en otros grupos de aves. Con el fin de detectar e identificar los parásitos causales de infecciones por haemosporidios, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de colibríes en seis localidades. La presencia de infección se llevó a cabo por PCR y la identificación de los parásitos se hizo a partir de secuencias del gen mitocondrial Citocromo b (Cyt b). Se obtuvieron 86 muestras de sangre de 20 especies de colibríes. La prevalencia de infección en general fue del 43 % y en el 18 % de las muestras infectadas del colibrí *Amazilia colirufa* (*Amazilia tzacatl*) se identificaron secuencias de *Haemoproteus archilochus* correspondientes al linaje HUMHA4. Se reporta por primera vez para Colombia la presencia de *H. archilochus* en *A. tzacatl*, por medio de técnicas de biología molecular. Este parásito podría estar implicado en la haemoproteosis de colibríes en el país.

Palabras Clave: Aves, biología molecular, infecciones, parásitos, sangre.

ABSTRACT

Haemosporidian infection in hummingbirds has not been studied in agroforestry or urban areas of the Eastern Andes' western slope, in the department of Santander, despite the existence of evidence of this in other groups of birds. To detect and identify the causative parasites of haemosporidium infections, we took blood samples from the jugular vein of hummingbirds in six locations. PCR carried out the diagnosis of the infection, and the identification of the parasites was made from sequences of the mitochondrial gene Cytochrome b (Cyt b). 86 blood samples were obtained from 20 species of hummingbirds. The prevalence of infection, in general, was 43 %, and in 18 % of the infected samples of Rufous-tailed Hummingbird (*Amazilia tzacatl*), sequences of HUMHA4 lineage from *Haemoproteus archilochus* were identified. The presence of *H. archilochus* in *A. tzacatl* is reported for the first time in Colombia using molecular biology techniques. This parasite could be implicated in the haemoproteosis of hummingbirds in the country.

Keywords: Birds, blood, infections, molecular biology, parasites.

Las infecciones producidas por parásitos del orden Haemosporida (Valkiūnas, 2005), se transmiten a una amplia gama de aves Bradshaw et al., (2017) afectando tanto la sangre como los órganos de su hospedero (Pérez-Tris et al., 2015). En colibríes (Familia: Trochilidae), aves endémicas del continente americano, se han reportado parásitos de los géneros *Haemoproteus* (Valkiūnas et al., 2004), *Leucocytozoon* (Matta et al., 2014) y *Plasmodium* (Marzal et al., 2015), como causantes de infecciones en poblaciones silvestres. Los estudios de Mijares et al. (2012), Harrigan et al. (2014), Marzal et al. (2015) y Moens et al. (2016), evidencian que las poblaciones de colibríes se encuentran infectadas frecuentemente y los parásitos que las afectan representan, por lo general, nuevos reportes en la literatura, tal es el caso de los cuatro linajes moleculares de *Haemoproteus archilochus* identificados en el norte de California en las especies colibrí de Ana (*Calypte anna*) y colibrí gorginegro (*Archilochus alexandri*) (Bradshaw et al., 2017).

En Colombia, los estudios orientados a identificar parásitos haemosporidios en colibríes han usado métodos de microscopía (Rodríguez et al., 2009; González, et al., 2014), herramientas moleculares (Gonzalez-Quevedo et al., 2016), o ambas técnicas (Mantilla et al., 2013; González et al., 2015; Lotta et al., 2016). Todas estas investigaciones no se enfocaron exclusivamente en muestras de colibríes y la mayoría se realizaron en áreas protegidas (González et al., 2015; Lotta et al., 2015; Lotta et al., 2016; Gonzalez-Quevedo et al., 2016). Villamizar-Escalante (2017), caracterizó con métodos moleculares parásitos haemosporidios en 110 especies de aves en el departamento de Santander; sin embargo, no incluyó muestras de colibríes.

La presente contribución se enfoca en estimar la prevalencia de infección, así como reportar la presencia de los parásitos haemosporidios cuyas secuencias del gen *Cyt b* se identificaron en poblaciones de colibríes en el departamento de Santander. Para esto, se muestrearon seis localidades del departamento ubicadas sobre la vertiente occidental de la Cordillera Oriental de los Andes (Fig. 1), caracterizadas por ser zonas agroforestales o urbanas. El esfuerzo de muestreo se estimó en 170 horas-red por localidad (*sensu* Villarreal et al., 2004). Un total de 86 individuos de 20 especies de colibríes fueron capturados (rango = 1 hasta 24 individuos por especie) y después de la toma de muestras sanguíneas fueron liberados. De cada individuo se extrajo entre 10 y 50 μ L de sangre por punción de la vena yugular, acorde a lo indicado por Owen (2011). La sangre se almacenó en tubos estériles con 50 μ L de etanol absoluto y para la extracción de ADN se procedió según lo descrito en el protocolo de Green y Sambrook (2012). El diagnóstico de la infección se llevó a cabo empleando PCR con los cebadores 343F y 496R descritos por Fallon et al. (2003). Posteriormente, con el objetivo de amplificar un fragmento de 478 pb del gen *Cyt b* de los parásitos, se hizo PCR anidada con las muestras diagnosticadas como positivas según se encuentra descrito

en Hellgren et al. (2004). Los productos de PCR anidada fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 6 % teñidos con AgNO_3 (Santos et al., 1993) y luego fueron purificados y secuenciados mediante la técnica Sanger en un ABI 3500 en el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular de la Universidad Nacional de Colombia (SSiGMoL). Las secuencias obtenidas se editaron con CodonCode Aligner v. 8.0.1 (CodonCode Corporation, 2018) y la identificación se realizó mediante el uso de BLAST (Altschul et al., 1990), comparando con secuencias depositadas en GenBank.

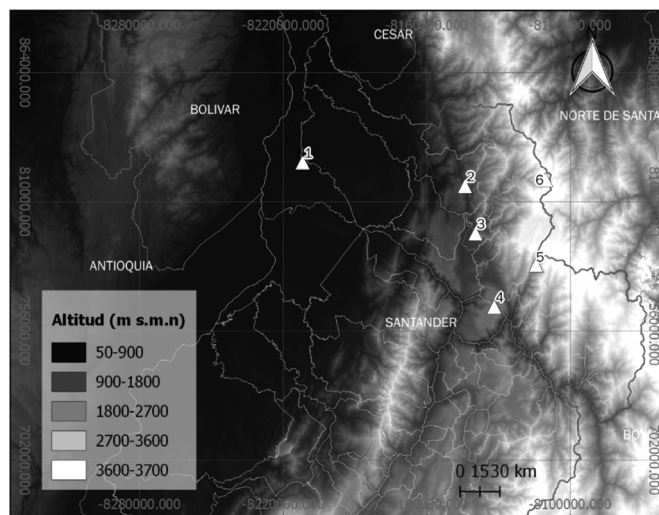


Figura 1. Localidades donde se muestrearon colibríes en el presente estudio. 1. Campo Duro, Municipio de Puerto Wilches (65 m s. n. m.); 2. San Benito, Municipio de Rionegro (902 m s. n. m.); 3. Campus Central de la Universidad Industrial de Santander – UIS, Municipio de Bucaramanga (959 m s. n. m.); 4. Hacienda El Roble, Municipio de Los Santos (1650 m s. n. m.); 5. La Esparta, Municipio de Santa Bárbara (1900 m s. n. m.); 6. La Laguna, Municipio de Vetas (3417 m s. n. m.).

Los resultados aquí reportados, no se corroboraron con técnicas de microscopía, pero los métodos basados en PCR se han considerado como adecuados para este tipo de identificaciones (Fallon y Rickfles, 2008). La infección se presentó en 37 muestras de 12 especies de colibríes (Tabla 1), siendo la prevalencia del 43 %. La *Amazilia colirufa* (*Amazilia tzacatl*), especie de colibrí de amplia distribución que en Colombia se encuentra hasta 2000 m s. n. m. (McMullan, 2018), mostró infección en el 45,8 % de los individuos capturados ($n = 24$). El 18 % de estos presentaron identidad del 100 % con la secuencia del gen *Cyt b* de *Haemoproteus archilochus* KY560447, reportada previamente en GenBank por Bradshaw et al. (2017). Las secuencias aisladas en este estudio corresponden a muestras tomadas en la Vereda San Benito, Municipio de Rionegro, Santander (Fig. 1) y se encuentran depositadas en GenBank con número de acceso MW548593 y MW548594; estas presentan 478 pb idénticos, su contenido nucleotídico es 73,2 % de AT y 26,8 % de CG y se corresponden con el linaje HUMHA4 identificado por Bradshaw et al. (2017).

Tabla 1. Especies y número de individuos de colibríes diagnosticados con infección por haemosporidios siguiendo el método sugerido por Fallon et al. (2003).

Especies	No. de muestras analizadas	No. de muestras infectadas
<i>Florisuga mellivora</i>	3	2
<i>Glaucis hirsutus</i>	7	6
<i>Phaethornis anthophilus</i>	3	2
<i>Phaethornis guy</i>	3	1
<i>Colibri cyanotus</i>	3	1
<i>Colibri coruscans</i>	6	3
<i>Anthracothonax nigricollis</i>	4	4
<i>Adelomyia melanogenys</i>	1	0
<i>Lesbia victoriae</i>	7	0
<i>Ramphomicon microrhynchum</i>	2	0
<i>Chalcostigma heteropogon</i>	1	0
<i>Aglaeactis cupripennis</i>	1	0
<i>Coeligena coeligena</i>	1	0
<i>Coeligena torquata</i>	1	0
<i>Boissonneaua flavescens</i>	1	1
<i>Campylopterus falcatus</i>	1	1
<i>Saucerotia castaneiventris</i>	5	3
<i>Saucerotia cyanifrons</i>	11	2
<i>Amazilia tzacatl</i>	24	11
<i>Uranomitra franciae</i>	1	0
Total	86	37
Prevalencia (%)		43,0

Este es el primer reporte de secuencias del gen mitocondrial Cyt b de *H. archilochus* infectando a la especie *Amazilia colirufa* (*A. tzacatl*) en Colombia. El hemoparásito *H. archilochus* ha sido reportado en aves de la familia Trochilidae (Valkiūnas, 2005). La descripción de este haemosporidio por Coatney y West (1938), se realizó en un colibrí gorgirrubí (*Archilochus colubris*) muestreado en Nebraska, U.S.A. A nivel del Neotrópico, Bennett y Borrero (1976), usando métodos de microscopía, lo reportaron infectando un individuo del Pico de Hoz Común (*Eutoxeres aquila*) muestreado en el sur occidente colombiano. La presencia de *H. archilochus* en diferentes regiones de Colombia, puede tener implicaciones en la conservación de las especies silvestres de colibríes, debido a que esta infección afecta el desempeño reproductivo y la supervivencia de sus hospederos (Godoy et al., 2014).

La identidad del 100 % entre la secuencia KY560447 con las aquí reportadas, sugiere la versatilidad que tiene este haemosporidio para infectar distintas especies dentro de la familia Trochilidae presentes en diferentes regiones zoogeográficas dentro de su distribución. A partir de los hallazgos obtenidos con evidencias de biología molecular

se concluye que, *H. archilochus* infecta a *Amazilia colirufa* (*A. tzacatl*), hospedero no reportado en estudios anteriores. Adicionalmente, este haemosporidio se encuentra infectando colibríes en el departamento de Santander, lo cual sugiere la presencia de este en diferentes regiones de Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad industrial de Santander, al Proyecto VIE-UIS 2418 “Prevalencia y composición de hemoparásitos causantes de malaria en aves silvestres asociadas a agroecosistemas del departamento de Santander”, el cual cuenta con aval otorgado por el Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) de la misma universidad. Adicionalmente, agradecemos al profesor Enrique Arbeláez Cortés y a los dos revisores anónimos por sus contribuciones al manuscrito.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Mille, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bennett, G. F., y Borrero, H. J. I. (1976). Blood Parasites of Some Birds From Colombia. *Journal Wildl Diseases*, 12(3), 454-458. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-12.3.454>
- Bradshaw, A. C., Tell, L. A., Ernest, H. B., Bahan, S., Carlson, J., y Sehgal, R. N. M. (2017). Detection and prevalence of *Haemoproteus archilochus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in two species of California hummingbirds. *Parasitology Research*, 116(7), 1879-1885. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5463-5>
- Coatney, G. R., y West, E. (1938). Some Blood Parasites from Nebraska Birds. II. *The American Midland Naturalist*, 19(3), 601-612. <https://doi.org/10.2307/2420473>
- Fallon, S. M., y Rickfls, R. E. (2008). Parasitemia in PCR-detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds. *Journal of Avian Biology*, 39(5), 514-522. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2008.04308.x>
- Fallon, S. M., Ricklefs, R. E., Swanson, B. L., y Bermingham, E. (2003). Detecting Avian Malaria: An Improved Polymerase Chain Reaction Diagnostic. *Journal of Parasitology*, 89(5), 1044-1047. <https://doi.org/10.1645/GE-3157>
- Godoy, L. A., Tell, L. A., y Ernes, H. B. (2014). Hummingbird health: pathogens and disease conditions in the family Trochilidae. *Journal of Ornithology*, 155(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10336-013-0990-z>

- González, A. D., Lotta, I. A., García, L. F., Moncada, L. I., y Matta, N. E. (2015). Avian haemosporidians from Neotropical highlands: Evidence from morphological and molecular data. *Parasitology International*, 64(4), 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.01.007>
- González, A. D., Matta, N. E., Ellis, V. A., Miller, E. T., Ricklefs, R. E., y Gutiérrez, H. R. (2014). Mixed Species Flock, Nest Height, and Elevation Partially Explain Avian Haemoparasite Prevalence in Colombia. *PLOS ONE*, 9(6), e100695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100695>
- Gonzalez-Quevedo, C., Pabón, A., y Rivera-Gutierrez, H. F. Prevalence of haemosporidians in a Neotropical endemic bird area. *Avian Conservation and Ecology*, 11(1), 7. <https://doi.org/10.5751/ACE-00834-110107>
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4 ed.). Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Harrigan, R. J., Sedano, R., Chasar, A. C., Chaves, J. A., Nguyen, J. T., Whitaker, A., y Smith, T. B. (2014). New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. *Evolutionary Applications*, 7(7), 799-811. <https://doi.org/10.1111/eva.12176>
- Hellgren, O., Waldenström, J., y Bensch, S. (2004). A New PCR Assay for Simultaneous Studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from Avian Blood. *Journal of Parasitology*, 90(4), 797-802. <https://doi.org/10.1645/GE-184R1>
- Lotta, I. A., Gonzalez, A. D., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., Valkiūnas, G., Moncada, I. M., y 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. *Parasitology Research*, 114(3), 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., y Matta, N. E. (2016). *Leucocytozoon* Diversity and Possible Vectors in the Neotropical highlands of Colombia. *Protist*, 167(2), 185-204. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.02.002>
- Mantilla, J. S., Matta, N. E., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., González, A. D., y Moncada, L. I. (2013). Identification of *Plasmodium* (Haemamoeba) *lutzi* (Lucena, 1939) from *Turdus fuscater* (Great Thrush) in Colombia. *Journal of Parasitology*, 99(4), 662-668. <https://doi.org/10.1645/12-138.1>
- Marzal, A., García-Longoria, L., Cárdenas Callirgos, J. M., y Sehgal, R. N. (2014). Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. *Biological Invasions*, 17(1), 39-45. <https://doi.org/10.1007/s10530-014-0718-x>
- Matta, N. E., Lotta, I. A., Valkiūnas, G., González, A. D., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., Moncada, L. I., y Rodríguez-Fandiño, O. A. (2014). Description of *Leucocytozoon quynzae* sp. nov. (Haemosporida, Leucocytozoidae) from hummingbirds, with remarks on distribution and possible vectors of leucocytozoids in South America. *Parasitology Research*, 113(2), 457-468. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3675-x>
- McMullan, M. (2018). *The Field Guide to the Birds of Colombia*. Rey Naranjo Editores S.A.S.
- Mijares, A., Rosales, R., y Silva-Iturriza, A. Hemosporidian Parasites in Forest Birds from Venezuela: Genetic Lineage Analyses. *Avian Diseases*, 56(3), 583-588. <https://doi.org/10.1637/10058-011312-ResNote.1>
- Moens, M. A. J., Valkiūnas, G., Paca, A., Bonaccorso, E., Aguirre, N., y Pérez-Tris, J. (2016). Parasite specialization in a unique habitat: hummingbirds as reservoirs of generalist blood parasites of Andean birds. *Journal of Animal Ecology*, 85(5), 1234-1245. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12550>
- Owen, J. C. (2015). Collecting, processing, and storing avian blood: a review. *Journal of Field Ornithology*, 82(4), 339-354. <https://doi.org/10.1111/j.1557-9263.2011.00338.x>
- Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Križanauskienė, A., Waldenström, J., y Bensch, S. (2005). What are malaria parasites? *Trends Parasitol*, 21(5), 209-211. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.03.001>
- Rodríguez, O. A., Moya, H., y Matta, N. E. (2009). Avian blood parasites in the National Natural Park Chingaza: high Andes of Colombia. *Hornero*, 24(1):1-6.
- Santos, F. R., Pena, S. D., y Epplen, J. T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetics*, 90(6), 655-656. <https://doi.org/10.1007/BF00202486>
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Brooks, D. R., Hanelt, B., Brant, S. V., Sutherlin, M. E., y Causey, D. (2004). Additional Observations on Blood Parasites of Birds in Costa Rica. *Journal Wildlife Diseases*, 40(3), 555-561. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.3.555>
- Valkiūnas G. (2005). *Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia* (pp. 1-5). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203643792.ch0>
- Villamizar-Escalante, D. (2017). *Prevalencia y diversidad de hemoparásitos causantes de malaria en comunidades de aves del departamento de Santander, Colombia* [Tesis de pregrado]. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander.
- Villareal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, H., Mendoza, M., Ospina, M., y Umaña, A. M. (2004). *Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad*. Programa de inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.