



ORIGINAL

Detección microscópica y molecular de *Plasmodium spp.* en flamencos (*Phoenicopterus ruber*) mantenidos bajo cuidado humano en Zoofari, Centro de Conservación, Morelos, México

Microscopic and molecular detection of Plasmodium spp. in American flamingos (Phoenicopterus ruber) kept under human care in Zoofari Conservation center in Morelos, Mexico

Julian Mejia Restrepo¹, Luis Carrillo D'Lacoste², Andrea Jiménez Marín³, Rafael Ojeda Flores², Andrés Ducoing Watty⁴, Dafne Limón Civera⁵, Mario Soto Salas⁶, Liliana Aurora Ramos Garduño²

¹ MVZ, Estudiante del Programa Único de Internado en Medicina Veterinaria y Zootecnia- Fauna Silvestre, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México

² Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México

³ Departamento de Zoología, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México

⁴ Departamento de Genética y Bioestadística. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México

⁵ Especialista en Medicina y cirugía veterinarias (Fauna Silvestre) FMVZ, UNAM. México

⁶ Médico Veterinario del Centro de Conservación Zoofari, Morelos, México. México

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aurorar25@gmail.com (Liliana Aurora Ramos Garduño).

Recibido el 25 de mayo de 2020; aceptado el 10 de septiembre de 2020.

Cómo citar este artículo:

Mejia Restrepo J, Carrillo D'Lacoste L, Jiménez Marín A, Ojeda Flores R, Ducoing Watty A, Limón Civera D, Soto Salas M, Ramos Garduño LA. Detección microscópica y molecular de *Plasmodium spp.* en flamencos (*Phoenicopterus ruber*) mantenidos bajo cuidado humano en Zoofari, Centro de Conservación, Morelos, México. JONNPR. 2021;6(4):651-64. DOI: 10.19230/jonnpr.3789

How to cite this paper:

Mejia Restrepo J, Carrillo D'Lacoste L, Jiménez Marín A, Ojeda Flores R, Ducoing Watty A, Limón Civera D, Soto Salas M, Ramos Garduño LA. Microscopic and molecular detection of *Plasmodium spp.* in American flamingos (*Phoenicopterus ruber*) kept under human care in Zoofari Conservation center in Morelos, Mexico. JONNPR. 2021;6(4):651-64. DOI: 10.19230/jonnpr.3789



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License
La revista no cobra tasas por el envío de trabajos, ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

Resumen

Objetivos. Establecer la prevalencia de *Plasmodium* en la población de *Phoenicopterus ruber* mantenidos bajo cuidado humano en el Centro de Conservación Zoofari, Morelos, México.

Configuración y Diseño. Se han presentado reportes de vectores de malaria aviar pertenecientes a la familia Culicidae en estado de Morelos, México. La malaria aviar puede afectar diversas especies de aves incluyendo Phoenicopteriformes (*Phoeniconaias minor*, *Phoenicopterus chilensis*) la población de interés podría ser portadora subclínica de *Plasmodium*.

Materiales y Métodos. se realizó un estudio exploratorio en el total de la población de *Phoenicopterus ruber*. En la investigación se implementaron dos técnicas de diagnóstico de hemoparásitos, la primera corresponde a análisis de frotis sanguíneos teñidos con una tinción rápida tipo Romanowsky los cuales fueron evaluados mediante microscopía óptica convencional y la segunda concierne la realización de la PCR utilizando iniciadores para amplificar ADN mitocondrial de tres especies de hemoparásitos (*Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*)

Análisis Estadístico utilizado. los resultados negativos del estudio no permiten realizar análisis estadístico

Resultados. En la evaluación mediante microscopía convencional no se evidenció en ningún frotis sanguíneo, presencia de merogonias o gránulos de hemozoína, obteniendo una totalidad de 80 muestras negativas. Las PCR realizadas bajo las condiciones utilizadas no demostraron amplificación exitosa de ADN parasitario.

Conclusiones. Nuestro estudio corresponde al primero de este tipo en la región. Después de implementar dos técnicas diferentes de diagnóstico para malaria aviar no se obtiene evidencia de la presencia de hemoparásitos en la población de *Phoenicopterus ruber*. Este tipo de investigaciones permite entender la dinámica e identificar enfermedades emergentes que puedan afectar a los animales y al hombre en una determinada región geográfica.

Palabras clave

Malaria aviar; Plasmodium; Phoenicopterus ruber; Hemoparásito; American Flamingo; PCR; Microscopía óptica; Medicina de la conservación



Abstract

Aims. The goal of the current study was to determine the prevalence of *Plasmodium* in the population of *Phoenicopterus ruber* kept under human care at Zoofari Conservation Center, Morelos, Mexico

Settings and Design. Avian malaria vectors belonging to the family Culicidae has been reported at different Mexican States. Malaria infections compromise different host ranges including Phoenicopteriformes (*Phoeniconaias minor*, *Phoenicopterus chilensis*). The singled population housed in Zoofari, Conservation Center may harbor subclinical malaria (*Plasmodium*) infections.

Methods and Material. A descriptive cross-sectional study in a singled population of American flamingos (*Phoenicopterus ruber*). We compared and contrasted two diagnostic techniques, microscopy and polymerase chain reaction (PCR) for avian haemosporidia. In this study 80 blood smears stained in a Romanowsky stain were examined by microscopy, also molecular analysis were conducted, PCR was performed with the use of primers that amplifies parasite mtDNA from species of *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*.

Results. A total of 80 *Phoenicopterus ruber* birds were examined for malarial parasites using both microscopy and PCR diagnostic methods, none of them were positives.

Conclusions. Our study corresponds to the first of its kind in the region. After implementing two different diagnostic methods for avian malaria, no evidence was obtained of the presence of hemoparasites in the *Phoenicopterus ruber* population. This type of research allows us to understand the dynamics and identify emerging diseases that can affect animals and man in a certain geographic region.

Keywords

Avian malaria; Plasmodium; Phoenicopterus ruber; Hemoparasite; American flamingo; PCR; Light microscopy; Conservation medicine

Contribución a la literatura científica

El presente documento es el resultado de la implementación de dos herramientas diagnósticas para malaria aviar (microscopía directa convencional y PCR) en una población de flamencos americanos bajo cuidado humano en el estado de Morelos, México (Figura 1).



Figura 1

La realización de pruebas moleculares como la PCR incrementa la sensibilidad de diagnóstico al compararse con la microscopía óptica. Después de implementar iniciadores específicos para *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* no se obtiene evidencia de la presencia de hemoparásitos. La vigilancia epidemiológica es una herramienta de prevención sanitaria de utilidad en parques zoológicos, permiten entender la dinámica e identificar enfermedades emergentes que puedan afectar a los animales y al hombre en una determinada región geográfica. Es el primer estudio de su tipo realizado en la región.

Introducción

El estado de conservación del flamingo americano (*Phoenicopterus ruber*) se considera en preocupación menor acorde a la lista roja de la UICN⁽¹⁾ sin embargo, en México sus poblaciones podrían desaparecer en un mediano a corto plazo lo cual lo cataloga como especie amenazada según la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010⁽²⁾. Esta especie es la más colorida de las seis actualmente reconocidas, presentando tonalidades rosas y naranjas, tiene un tamaño entre 120-140 cm de altura y una envergadura de alas de 150 cm aproximadamente. A pesar de su altura tiene pesos que no superan los 3 kg, siendo los machos más pesados y altos que las hembras⁽³⁾.

Los parásitos representan el tipo de vida más exitoso de la Tierra, teniendo una distribución global⁽⁴⁾. Estos, juegan un papel esencial en la estructura y dinámica de las comunidades biológicas, sus efectos pueden mediar la densidad de una población y pueden



ser cruciales en las interacciones ecológicas entre poblaciones. Dichas interacciones son particularmente relevantes en sistemas hospedero-parásito, ya que estos últimos frecuentemente modifican el comportamiento del hospedero o su fisiología⁽⁵⁾. En medicina de la conservación, el papel que juegan los parásitos es complejo ya que estos organismos pueden amenazar la salud de los individuos y sus poblaciones, sin embargo, son críticos para el mantenimiento de las dinámicas propias de los ecosistemas⁽⁶⁾. Las interacciones entre los parásitos y sus hospederos pueden promover o inhibir la coexistencia de los hospederos. Los parásitos pueden tener fuertes impactos ecológicos, incluso aquellos con bajo nivel de virulencia^(6,7).

Las colecciones animales mantenidas bajo cuidado humano en un ambiente donde coexisten en espacios al aire libre con otras especies silvestres pueden jugar un papel relevante como centinelas de los animales en la región geográfica en cuestión. Son los mismos patógenos que pueden afectar tanto a los animales cautivos como a los de vida libre y dichas poblaciones también pueden compartir vectores^(6,7).

Los hemoparásitos con mayor importancia en las aves son los representantes del orden Hemosporidia (Phylum: Apicomplexa), transmitidos por vectores dípteros (mosquitos, jejenes, moscas planas). Se reconocen cuatro géneros patógenos en las aves: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* y *Fallicia*^(4,8).

Las condiciones de cautiverio favorecen una rápida distribución de los agentes infecciosos, afectando la salud y la capacidad reproductiva. Esta última de alta importancia en los zoológicos donde suelen establecerse programas de crianza y reproducción de especies de interés y/o amenazadas⁽⁹⁾.

Las infecciones por hemoprotozoos en aves están bien definidas, pueden cursar de manera asintomática o de forma aguda con desenlaces fatales^(4,10). Sin embargo, los efectos de la infección varían según la especie del agente y del hospedador⁽¹¹⁾.

Se han descrito casos de hemosporidiosis en diversos zoológicos a nivel global⁽¹²⁻¹⁶⁾. Realizar estudios en animales mantenidos en zoológicos, facilita la obtención de muestras (Figura 2) y disminuye costos, permite dar seguimiento clínico a los individuos, así como sugerir soluciones terapéuticas y de control de vectores de forma inmediata⁽¹²⁾. Una población de *Phoenicopterus chilensis* de un zoológico de Chicago presentó alta prevalencia de *Plasmodium rouxi*/*P. vaughani* demostrando que los flamencos pueden cursar infecciones subclínicas de malaria o presentar mayor susceptibilidad ante dichas especies de hemoparásitos⁽¹³⁾.



Figura 2

El diagnóstico integral de malaria aviar, involucra tanto la detección del parásito en frotis de sangre periférica (pudiendo identificar estadios de desarrollo intraeritrocitarios) ⁽¹⁰⁾, como los métodos moleculares, los cuales son más sensibles que las técnicas de microscopía óptica tradicionales. Además la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede proveer información que permita identificar la especie y el linaje específico del agente involucrado ^(14,15).

La malaria aviar puede afectar diversas especies de aves incluyendo Phoenicopteriformes (*Phoeniconaias minor*, *Phoenicopterus chilensis*)^(12,13,16), la población albergada en el centro de conservación Zoofari en el estado de Morelos podría ser portadora subclínica de *Plasmodium*.

El objetivo del presente estudio es establecer la prevalencia de *Plasmodium* en una población de *Phoenicopterus ruber*, mantenida bajo cuidado humano, utilizando técnicas de microscopía óptica convencional y moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Población y métodos

Área de estudio y manejo

La toma de muestras sanguíneas se realizó el 9 de febrero del 2020 en el Centro de Conservación Zoofari, localizado en el municipio de Amacuzac, en el suroeste del estado de Morelos, México (18° 36' 54.79" N y 99° 26' 25.73").



Colección de muestras y preparación

El estudio se realizó mediante la aprobación del Comité interno para el cuidado y uso de los animales CICUA-FMVZ-UNAM con el número de protocolo # 090. Un total de 80 individuos de la especie *Phoenicopterus ruber* fueron evaluados, los cuales corresponden a la población total de flamencos americanos del lugar de estudio. Se realizó examen físico general de cada individuo de la colección; cada uno contaba con anillo de marcaje, el cual fue utilizado para identificar las muestras de cada ejemplar.

Los individuos se contuvieron mediante restricción física, exponiendo los miembros pélvicos de cada flamenco para obtener las muestras sanguíneas. Se realizó la extracción de sangre, 2 ml por individuo, mediante venopunción de la vena tibio tarsal, utilizando agujas de calibre 23G. Inmediatamente se prepararon frotis sanguíneos y se almacenaron 2 microtubos de sangre de 500 µl cada uno (Microvette® 500 con Heparina de litio). Una vez obtenidas las muestras se mantuvieron en refrigerantes en un termo transportador durante 4 horas hasta que se trasladaron a un congelador a -18°C para el posterior análisis molecular.

Procesamiento de frotis sanguíneos

Se realizaron 80 frotis sanguíneos (uno por cada individuo), por medio de la técnica de squash los cuales se fijaron al aire y fueron teñidos posteriormente con una tinción rápida para hematología tipo Romanowsky de laboratorios HYCEL® (metanol como primer componente fijador, segundo, colorante base de eosina y el tercero base azul de metileno). Para la tinción, cada frotis se mantuvo un minuto en cada reactivo, en el orden mencionado, para después enjuagarse con agua corriente. Una vez secos, se montaron y protegieron con resina para microscopía Entellan y Xilol marca Merck® y cubreobjetos. La búsqueda e identificación de hemoparásitos se realizó mediante un microscopio óptico, revisando 10 campos a 40 X y después detallando con un objetivo de inmersión a 100 X, cubriendo alrededor de 2 cm² del frotis sanguíneo.

Análisis molecular

Las muestras de sangre fueron conservadas a -18°C en contenedores de 500 µl (Microvette® 500 con Heparina de litio). Posteriormente se trasladaron al laboratorio de



Biología Molecular del departamento de Zoología, Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México para su análisis molecular por PCR.

El ADN se extrajo a partir de sangre con anticoagulante utilizando el Kit DNeasy® Blood & tissue (Qiagen) implementando el protocolo sugerido por el fabricante. En este estudio la PCR se utilizó con un set de cebadores HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') y HaemNR3 (5' ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') para amplificar el ADN mitocondrial (ADN_{mt}) del parásito de aproximadamente 600 pares de bases (bp) de tres especies de hemoparásitos que afectan las aves (*Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*)^(14,17).

Todas las PCR se realizaron en un volumen final de 15 µl, que incluyeron un aproximado de 30 ng de ADN genómico total, 1x de buffer 5x MyTaq® (Bioline), 0,3 µM de cada iniciador (HaemNFI, HaemNR3) y 0,5 U de MyTaq® DNA polimerasa (Bioline). Se implementó un control negativo para las 80 muestras con el fin de detectar falsos positivos.

Las PCR fueron sometidas al siguiente protocolo de amplificación: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50°C, 45 segundos a 72°C por 35 ciclos. Las muestras fueron incubadas antes de la reacción cíclica a 94°C durante 3 minutos. Para evidenciar la amplificación, se cargaron 2 µl del producto final del PCR teñido con GelRed en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos. El gel fue visualizado en un fotodocumentador UVP (MultiDoc-it).

Resultados

Se obtuvo un total de 80 muestras sanguíneas pertenecientes a flamencos americanos (*Phoenicopterus ruber*). De estos ejemplares el 45% (n=36) fueron hembras y el 32,5 % (n=36) fueron machos, del 22,5% (n=18) remanente se desconoce el sexo. El 77,5% (n=62) representa ejemplares adultos y el 22,5% (n=18) animales jóvenes menores a un año.

En la evaluación mediante microscopía convencional no se evidenció en ningún frotis sanguíneo, presencia de merogonias o gránulos de hemozoína también llamado pigmento malárico, peculiaridad que permite identificar micro gametocitos y macro gametocitos intraeritrocitarios y los distingue de otros protistas intracelulares (*Babesia*, *Isospora*, *Hepatozoon*, *Toxoplasma*)⁽¹⁸⁻²¹⁾.

Las PCR realizadas bajo las condiciones descritas anteriormente no demostraron amplificación exitosa de ADN parasitario. Los resultados negativos en ambas pruebas diagnósticas no permiten realizar análisis estadísticos descriptivos ni inferenciales.



Discusión

La malaria aviar es una amenaza para las poblaciones de aves ⁽¹²⁾. Mosquitos hematófagos, hembras de la familia Culicidae son los vectores de la malaria asociada a *Plasmodium spp.* en aves ⁽¹⁸⁾. En Phoenicopteriformes se ha evidenciado la presencia de *Plasmodium nucleophilum*, *P. rouxi*-*P. vaughani* en individuos aparentemente sanos ^(12,13). Diversos hemoparásitos han sido hallados en la avifauna mexicana, las especies afectadas y los parásitos encontrados por Bennet en 1991 tienen más afinidad con aves y agentes asociados al neotrópico que a las zonas neárticas; *Haemoproteus* seguido por *Plasmodium* son los géneros con mayor prevalencia ⁽²²⁾.

Autores como Belo et al 2009, consideran la microscopía óptica como la prueba de oro para la detección de malaria; en sus estudios encontraron 29 muestras positivas a la PCR de 31 aves positivas a la microscopía óptica, arrojando un 94% de sensibilidad y 81 negativos a la PCR de 96 aves negativas a la microscopía óptica, con un 84% de especificidad y la estiman de acuerdo al índice de Youden como la prueba de oro con un puntaje de 0.78 ⁽²³⁾. Aun así, conlleva ciertas limitaciones ya que requiere una revisión concienzuda y experiencia del observador ^(8,23,24); también depende de la intensidad de la parasitemia para visualizar a los hemoparásitos. Al compararse con métodos diagnósticos moleculares presenta una baja tasa de detección ⁽²⁴⁾. Por lo antes comentado, lo recomendable es combinar las pruebas de detección ^(3,6,14). El método molecular para detectar e identificar hemoparásitos basado en la reacción en cadena de la polimerasa, apunta y amplifica una región específica del genoma del parásito ⁽²⁵⁾.

La detección precisa de malaria mediante la PCR al utilizar los cebadores apropiados tiene el potencial de estimar la prevalencia de los parásitos en una muestra aún en casos con bajas parasitemias ⁽²⁵⁾. Esto la hace una prueba altamente sensible, logrando detectar hasta 1 eritrocito infectado por cada 100.000 ⁽²⁶⁾. Rhim en el 2018 reportó un 10% más de resultados positivos a *Plasmodium* y *Haemoproteus* en aves silvestres utilizando PCR en comparación con los frotis sanguíneos evaluados bajo el microscopio ⁽²⁷⁾. Otros autores refieren una detección de infecciones de hasta 5 parásitos por μl con un 100% de especificidad, sin distinguir si el organismo parasitario es viable o no ⁽²⁴⁾.

En nuestra investigación, al realizar la PCR simple con los cebadores (HaemNFI/HaemNR3) que amplifican ADN mitocondrial parasitario de *Plasmodium*,



Haemoproteus, *Leucocytozoon*, utilizados por Chagas 2017⁽¹²⁾ y Hellgreen en el 2004⁽¹⁴⁾, no se obtuvo amplificación alguna.

La realización de diagnóstico de *Plasmodium* mediante PCR simples utilizando cebadores diferentes a los utilizados en el presente estudio han sido descritos por otros autores ^(14,26,28). El PCR anidado realizado por Hellgren permitió amplificaciones positivas de ADN parasitario de intensidades de infección superiores o iguales a 1 parásito en 1.000.000 de células sanguíneas (> 0,0001%). Puede presentarse un aumento hasta del 12 % en la proporción de detección de infecciones por *Plasmodium* al realizar PCR anidados en comparación con la PCR simple ⁽¹⁴⁾.

El diagnóstico de malaria en aves por PCR es difícil de perfeccionar en el laboratorio puesto que los eritrocitos nucleados de las aves proveen ADN mitocondrial del hospedador diluyendo casi dos veces la proporción de ADN del parásito, convirtiéndose en una limitación del rendimiento de la prueba cuando se presentan niveles bajos de parasitemia asociado a infecciones crónicas^(25,29).

La tasa de infección de los animales evaluados en el presente estudio podría ser muy baja o nula, lo cual explicaría la ausencia de positivos al frotis sanguíneo y a la PCR.

Las condiciones medioambientales pueden influir en la distribución de los vectores retardando el tiempo de desarrollo de esporogonias al exponerse a temperaturas menores de 15 °C ⁽¹²⁾. Varias especies de culícidos ornitofílicos y de importancia médica han sido reportados en México, incluyendo el estado de Morelos ⁽³⁰⁾.

Existe una gran diversidad de linajes de parásitos que se dispersan heterogéneamente en las regiones biogeográficas. Para los hemosporidianos aviares, la disponibilidad de varios agentes vectores o transmisores y la diversidad de especies hospedadoras incrementa la posibilidad de infección al compararse con zonas con baja cantidad de vectores y de hospedadores ⁽³¹⁾.

Las poblaciones y comunidades de parásitos son bioindicadores útiles del estrés ambiental, la estructura de la red trófica y la biodiversidad. El papel de los parásitos es esencial en la estructura de comunidades biológicas y es crítico para el mantenimiento saludable de los ecosistemas aunque por otro lado puedan amenazar la salud de los individuos y de sus poblaciones ⁽⁶⁾.

La malaria aviar es una enfermedad que puede ser peligrosa en animales cautivos. Es importante mantener el monitoreo en los programas de medicina preventiva que incluyan



estudios moleculares, además de estudiar y reducir los vectores presentes en esta región geográfica⁽⁴⁾. En general, los hemoparásitos son importantes generadores de enfermedades y no se debe olvidar que al mantener el monitoreo en una población bajo cuidado humano, además que ayuda a mantenerla saludable, provee información valiosa hacia las poblaciones silvestres con quienes cohabitan (centinelas)⁽¹²⁾.

Nuestro estudio corresponde al primero de este tipo en la región. Como conclusión después de implementar dos técnicas diferentes de diagnóstico para malaria aviar no se obtiene evidencia de la presencia de hemoparásitos en esta población de *Phoenicopterus ruber*. Estos métodos de vigilancia de enfermedades en poblaciones zoológicas permiten entender la dinámica e identificar enfermedades emergentes que puedan afectar a los animales y al hombre en una determinada región geográfica⁽³²⁾. Como elementos complementarios al presente estudio se recomienda realizar PCR anidado en las futuras muestras de sangre de aves lo cual podría incrementar la especificidad y sensibilidad al amplificar el fragmento de ADN con un número bajo de copias ^(12,14,17,25), así como incluir estudios moleculares de vectores de hemoparásitos encontrados en la zona de estudio.

Reconocimientos

Agradecemos al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México por facilitar las instalaciones de su laboratorio de Biología Molecular para la realización de las PCR, al departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma institución y al Centro de Conservación Zoofari por permitir realizar el trabajo de campo y la toma de muestras sanguíneas de los flamencos de su colección zoológica. A la MVZ Ángela Rodríguez Hernández, MVZ René Oswaldo Silva Castillo, MVZ Samuel Flores Ceballos, MVZ Amalia Villavicencio Oropeza, MVZ Ana Estephanía Castro Martínez, MVZ Luis Alejandro Vázquez Santiago por su participación en el trabajo de campo. Al Biólogo Antonio Abella Medrano por sus aportes conceptuales asociados al agente parásito.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés en el presente estudio.



Referencias

1. *Phoenicopterus ruber* [Internet]. The IUCN Red List of Threatened Species. 2018 [cited 2020 Mar 30]. Available from: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22729706A132180192.en>.
2. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana [Internet]. Mexico: Diario oficial; 2010 p. 1–77. Available from: <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/DO2454.pdf>
3. Kight CR. Flamingo. Kight CR, editor. London: Reaktion Books; 2015. 175 p.
4. Valkiūnas G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. First. Valkiūnas G, editor. Boca Ratón, Florida, USA.: CRC Press Book; 2005. 947 p.
5. Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JC. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biol.* 2005;3(9):1590–3.
6. Hatcher MJ, Dick JTA, Dunn AM. Parasites that change predator or prey behaviour can have keystone effects on community composition. *Biol Lett* [Internet]. 2014;10(1):0–4. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsbl.2013.0879>
7. Suzán Azpiri G, Galindo Maldonado F, Ceballos González G. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Vet Méx.* 2000;31(3):223–30.
8. Santiago-alarcon D, Carbo-Ramirez P. Parásitos Sanguíneos de Malaria y Géneros Relacionados (Orden : Haemosporida) en aves de México : Recomendaciones Metodológicas para campo y laboratorio. *Ornitol Neotrop.* 2015;26(January):59–77.
9. Panayotova-Pencheva MS. Parasites in Captive Animals: A Review of Studies in Some European Zoos. *Zool Garten* [Internet]. 2013;82(1–2):60–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.zoolgart.2013.04.005>
10. Rae M. Hemoprotozoa of caged and aviary birds. *Semin Avian Exot Pet Med.* 1995;4(3):131–7.
11. Palinauskas V, Valkiunas G, Bolshakov C V., Bensch S. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Exp Parasitol.* 2008;120(4):372–80.
12. Chagas CRF, Valkiūnas G, De Oliveira Guimarães L, Monteiro EF, Guida FJV, Simões RF, et al. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian



- parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. *Malar J.* 2017;16(1):1–20.
13. Thurber MI, Gamble KC, Krebs B, Goldberg TL. Molecular Detection of Plasmodium in Free-Ranging Birds and Captive Flamingos (*Phoenicopterus Chilensis*) in Chicago . *J Zoo Wildl Med.* 2014;45(4):749–54.
 14. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. a New Pcr Assay for Simultaneous Studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus From Avian Blood. *J Parasitol.* 2004;90(4):797–802.
 15. Bernotiene R, Palinauskas V, Iezhova T, Murauskaite D, Valkiunas G. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. *Exp Parasitol.* 2016;163:31–7.
 16. Peirce MA. Pathogenic subspecies of Plasmodium relictum found in African birds. *Vet Rec.* 2005;156(10):328.
 17. Ferrell ST, Snowden K, Marlar AB, Garner M, Lung NP. Fatal Hemoprotozoal Infections in Multiple Avian Species in a Zoological Park. *J Zoo Wildl Med.* 2007;38(2):309–16.
 18. Valkiūnas G. Life cycle and morphology. In: Valkiunas G, editor. Avian malaria parasites and other haemosporidia. First. Boca Ratón, Florida, USA.: CRC Press Book; 2005. p. 17–47.
 19. Valkiunas G, Iezhova TA. Keys to the avian malaria parasites. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):17–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2359-5>
 20. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunte B. Parasitic Diseases of Wild Birds. In: Atkinson CT, editor. Parasitic Diseases of Wild Birds. First. John Wiley & Sons; 2008. p. 35–53.
 21. Fecchio A, Chagas CRF, Bell JA, Kirchgatter K. Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta Trop* [Internet]. 2020;204(January):105364. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105364>
 22. Bennett GF, Aguirre AA, Cook RS. Blood Parasites of Some Birds from Northeastern Mexico. *J Parasitol.* 1991;77(1):38.
 23. Belo NO, Passos LF, Júnior LMC, Goulart CE, Sherlock TM, Braga EM. Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Prev Vet Med.* 2009;88(3):220–4.
 24. Makler MT, Palmer CJ, Ager AL. A review of practical techniques for the diagnosis of



- malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92(4):419–33.
25. Freed LA, Cann RL. Dna Quality and Accuracy of Avian Malaria Pcr Diagnostics: a Review. *Condor.* 2006;108(2):459.
26. Waldenström J, Bensch S, Hasselquist D, Östman Ö. A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting Plasmodium and Haemoproteus Infections From Avian Blood. *J Parasitol.* 2004;90(1):191–4.
27. Rhim H, Bae J, Kim H, Han JI. Prevalence and phylogenetic analysis of avian haemosporidia in wild birds in the republic of korea. *J Wildl Dis.* 2018;54(4):772–81.
28. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H, et al. Host specificity in avian blood parasites: A study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2000;267(1452):1583–9.
29. Videvall E. Genomic Advances in Avian Malaria Research. *Trends Parasitol [Internet].* 2019;35(3):254–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.12.005>
30. Ortega-Morales AI, Huerta H, Strickman D, Sánchez Ramos FJ, Landeros Flores J, Chávez EC. Registros de Mosquitos en México: Culex stigmatosoma Dyar y Cx. thriambus Dyar (Diptera: Culicidae) con Notas Taxonómicas para Ambas Especies . *Southwest Entomol.* 2011;36(2):177–96.
31. Clark NJ, Clegg SM, Lima MR. A review of global diversity in avian haemosporidians (Plasmodium and Haemoproteus: Haemosporida): New insights from molecular data. *Int J Parasitol [Internet].* 2014;44(5):329–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.004>
32. Deem S. Conservation Medicine to One Health: The Role of Zoologic Veterinarians. In: Miller RE, Fowler ME, editors. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine.* Eighth. St. Louis.: Elsevier-Saunders; 2015. p. 698–703.