

# Diagnosis of parasitic and potentially zoonotic viruses in the domestic pigeon (*Columba livia*) in three localities in Colombia.

## *Diagnosis of parasitic and potentially zoonotic viruses in the domestic pigeon (Columba livia) in three localities in Colombia.*

Nubia E. Matta<sup>1\*</sup>, Andrés Felipe Aponte-Gutiérrez<sup>2</sup>, Lina Marcela Pérez Arenas<sup>1</sup>, Felipe Andrés Gaitán Albarracín<sup>1</sup>, Brayan Andrés Gamboa-Suárez<sup>1,3</sup>, Jesús Alfredo Berdugo<sup>2</sup>, Lady Johana Correa Higuera<sup>4</sup>, Angie D. González G.<sup>1</sup>

### Pertenencia institucional

1 Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá-Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Grupo de Estudio Relación Parásito-Hospedero (GERPH). Colombia

2 Universidad Nacional de Colombia, Sede Orinoquía. Grupo de Investigación en Ciencias de la Orinoquía. Colombia

3 Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá-Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Salud Animal. Colo

4 Departamento de Ciencias Básicas Transversales, Universidad Internacional del Trópico Americano. Laboratorio de estudios moleculares de la región Orinoquía - LEMO, Universidad Internacional del Trópico Americano. Colombia

### Correspondencia

nemattac@unal.edu.co

### ORCID

Matta ORCID 0000-0003-1775-0804

Aponte-Gutiérrez ORCID

0000-0002-1308-6769

Pérez ORCID 0009-0000-8048-2019

Gaitán ORCID 0009-0005-7143-5946

Gamboa-Suárez

<https://orcid.org/0009-0007-6961-582>

82

### Resumen

Las palomas domésticas (*Columba livia*) son reservorios de diversos agentes infecciosos, representando un riesgo para la salud pública. En Colombia, esta especie introducida es habitual en entornos urbanos, donde diversos estudios microbiológicos se han adelantado. Sin embargo, su papel en la circulación del Virus del Nilo Occidental (VNO) y la Influenza Aviar (IA) sigue siendo desconocido. Este estudio evaluó la presencia de enteroparásitos, hemoparásitos, así como la detección de VNO y VIA en palomas ferales capturadas en Bogotá, Arauca y Aguazul. Se recolectaron muestras fecales, de sangre, e hisopados orales y cloacales de 48 individuos. Los análisis parasitológicos incluyeron examen en fresco para parásitos gastrointestinales y tinción de Giemsa para hemoparásitos. La detección viral se llevó a cabo mediante RT-qPCR utilizando TaqMan y SYBR-Green. Los resultados indican la presencia de *Haemoproteus columbae*, junto a la presencia de diferentes endoparásitos que incluyen *Eimeria*, *Blastocystis*, entre otros para Arauca y Bogotá. Discutimos resultados de resultados obtenidos por pruebas moleculares para los virus potencialmente zoonóticos. Continuar con la vigilancia activa en especies sinantrópicas como está es imprescindible para establecer estrategias de prevención y control, en contextos urbanos, donde el contacto frecuente entre humanos y palomas puede facilitar la transmisión de microorganismos.

### Palabras clave:

Paloma domésticas, parásitos gastrointestinales, hemoparásitos, virus-RNA

### Abstract

Domestic pigeons (*Columba livia*) are reservoirs of several infectious agents and represent a risk to public health. In Colombia, this introduced species is common in urban areas, where several microbiological studies have been conducted. However, its role in circulating West Nile virus (WNV) and avian influenza (AI) remains unknown. This study aimed to evaluate the presence of enteroparasites, haemoparasites, and the detection of WNV and AI in feral pigeons captured in Bogotá, Arauca and Aguazul. Faecal samples, blood samples, oral and cloacal swabs were collected from 48 individuals. Parasitological analyses included fresh examination for gastrointestinal parasites and Giemsa staining for haemoparasites. RT-qPCR was used to detect the virus using TaqMan and SYBR-Green. The results indicate the presence of *Haemoproteus columbae*, together with the presence of several endoparasites, including *Eimeria* and *Blastocystis*, among others, in Arauca and Bogota. We discuss the results of molecular testing for potentially zoonotic viruses. Continued active surveillance in synanthropic species such as this one is essential to establish prevention and control strategies in urban contexts, where frequent contact between humans and pigeons may facilitate the transmission of microorganisms.

### Key words:

Rock Dove, gastrointestinal parasites, haemoparasite, RNA-virus, influenza

**Diagnóstico parasitológico y de virus potencialmente zoonóticos en palomas domésticas  
(Columba livia) en tres localidades de Colombia**

**Diagnosis of parasitic and potentially zoonotic viruses in the domestic pigeon (Columba  
livia) in three localities in Colombia.**

**Nubia E. Matta<sup>1\*</sup>, Andrés Felipe Aponte-Gutiérrez<sup>2</sup>, Lina Marcela Pérez Arenas<sup>1</sup>,  
Felipe Andrés Gaitán Albarracín<sup>1</sup>, Brayan Andrés Gamboa-Suárez<sup>1,3</sup>, Jesús Alfredo  
Berdugo<sup>2</sup>, Lady Johana Correa Higuera<sup>4</sup>, Angie D. González G.<sup>1</sup>**

**Nubia E Matta [ORCID 0000-0003-1775-0804](https://orcid.org/0000-0003-1775-0804)**

**Andrés Felipe Aponte-Gutiérrez [ORCID 0000-0002-1308-6769](https://orcid.org/0000-0002-1308-6769)**

**Lina Marcela Pérez Arenas [ORCID 0009-0000-8048-2019](https://orcid.org/0009-0000-8048-2019)**

**Felipe Andrés Gaitán Albarracín [ORCID 0009-0005-7143-5946](https://orcid.org/0009-0005-7143-5946)**

**Brayan Andrés Gamboa-Suárez <https://orcid.org/0009-0007-6961-582X>**

**Jesús Alfredo Berdugo [ORCID 0000-0002-1556-6387](https://orcid.org/0000-0002-1556-6387)**

**Lady Johana Correa-Higuera [ORCID 0000-0001-6359-4000](https://orcid.org/0000-0001-6359-4000)**

**Angie Daniela González Galindo<sup>1</sup> [orcid.org/0000-0002-1772-2152](https://orcid.org/0000-0002-1772-2152)**

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá-Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Grupo de Estudio Relación Parásito Hospedero (GERPH).

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Sede Orinoquía. Grupo de Investigación en Ciencias de la Orinoquía.

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá-Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Salud Animal.

<sup>4</sup> Departamento de Ciencias Básicas Transversales, Universidad Internacional del Trópico Americano. Laboratorio de estudios moleculares de la región Orinoquía - LEMO, Universidad Internacional del Trópico Americano.

## Resumen

Las palomas domésticas (*Columba livia*) son reservorios de diversos agentes infecciosos, representando un riesgo para la salud pública. En Colombia, esta especie introducida es habitual en entornos urbanos, donde diversos estudios microbiológicos se han adelantado. Sin embargo, su papel en la circulación del Virus del Nilo Occidental (VNO) y la Influenza Aviar (IA) sigue siendo desconocido. Este estudio evaluó la presencia de enteroparásitos, hemoparásitos, así como la detección de VNO y VIA en palomas ferales capturadas en Bogotá, Arauca y Aguazul. Se recolectaron muestras fecales, de sangre, e hisopados orales y cloacales de 48 individuos. Los análisis parasitológicos incluyeron examen en fresco para parásitos gastrointestinales y tinción de Giemsa para hemoparásitos. La detección viral se llevó a cabo mediante RT-qPCR utilizando TaqMan y SYBR-Green. Los resultados indican la presencia de *Haemoproteus columbae*, junto a la presencia de diferentes endoparásitos que incluyen *Eimeria*, *Blastocystis*, entre otros para Arauca y Bogotá. Discutimos resultados de resultados obtenidos por pruebas moleculares para los virus potencialmente zoonóticos. Continuar con la vigilancia activa en especies sinantrópicas como está es imprescindible para establecer estrategias de prevención y control, en contextos urbanos, donde el contacto frecuente entre humanos y palomas puede facilitar la transmisión de microorganismos.

## Abstract

Domestic pigeons (*Columba livia*) are reservoirs of several infectious agents and represent a risk to public health. In Colombia, this introduced species is common in urban areas, where several microbiological studies have been conducted. However, its role in circulating West Nile virus (WNV) and avian influenza (AI) remains unknown. This study aimed to evaluate the presence of enteroparasites, haemoparasites, and the detection of WNV and AI in feral pigeons captured in Bogotá, Arauca and Aguazul. Faecal samples, blood samples, oral and cloacal swabs were collected from 48 individuals. Parasitological analyses included fresh examination for gastrointestinal parasites and Giemsa staining for haemoparasites. RT-qPCR was used to detect the virus using TaqMan and SYBR-Green. The results indicate the presence of *Haemoproteus columbae*, together with the presence of several endoparasites, including *Eimeria* and *Blastocystis*, among others, in Arauca and Bogota. We discuss the results of molecular testing for potentially zoonotic viruses. Continued active surveillance in synanthropic species such as this one is essential to establish prevention and control strategies

in urban contexts, where frequent contact between humans and pigeons may facilitate the transmission of microorganisms.

Palabras clave: Paloma domésticas, parásitos gastrointestinales, hemoparásitos, virus-RNA, influenza, VNO

Keywords: Rock Dove, gastrointestinal parasites, haemoparasite, RNA-virus, influenza, WNV

## **Introducción**

En 1951, el comité experto en zoonosis de la Organización Mundial de la Salud definió las zoonosis como “enfermedades e infecciones que son transmitidas naturalmente entre animales vertebrados y humanos” (Chomel, 2009). Las aves desempeñan un papel clave como reservorios de patógenos zoonóticos como bacterias, hongos, virus, ácaros y garrapatas (Kozdruń et al., 2015) La paloma *Columba livia* también conocida como paloma común, es una especie del orden Columbiformes, familia Columbidae fue introducida en Colombia, que originalmente se distribuía en el sur de Eurasia y del norte de África (Saborido, 2009). Actualmente, presenta una distribución pantropical y es reconocida por coexistir con el ser humano, siendo de interés ya que diferentes microorganismos con potencial zoonótico pueden emplearla como hospedero o pueden crecer en sus heces (Saborido, 2009, González-Acuña et al., 2007).

La coexistencia entre seres humanos y animales en las ciudades se ha incrementado dado el aumento de la población humana y de las especies animales que se han adaptado a un estilo de vida urbano. Dentro de este nuevo paisaje, la paloma común se ve beneficiada de las actividades humanas como estructuras de concreto que asemejan sus sitios de anidación, los desechos de comida y la alimentación de aves realizada como actividad recreativa; el establecimiento, la expansión y la colonización hace que actualmente se considera una especie invasora (NBII, IUCN/SSC, 2025, Scherf., 2000) Esta especie ha sido criada como mascota, como palomas mensajeras y luego introducidas como aves ornamentales en varios lugares del mundo, actualmente son empleadas también como alimento, , símbolo religioso y en investigación (Villalba-Sánchez et al., 2014).

*Columba livia* ha sido identificada como una fuente de patógenos que pueden afectar tanto a humanos como a otros animales. En el contexto de la salud pública, las zoonosis más relevantes

vinculadas a esta especie aviar incluyen clamidiosis, criptococosis, aspergilosis, salmonelosis, listeriosis y estafilococosis, colibacilosis resistente a antibióticos, cuya transmisión puede ocurrir por aerosolización de excretas o contacto directo con las mismas (González-Acuña et al., 2007; Barbosa-Brugés et al., 2021). También se han implicado en la transmisión de virus de alta relevancia sanitaria como el Virus del Nilo Occidental (VNO), el virus de Influenza aviar (IA), el de la Encefalitis de San Luis, la rubéola y la encefalomiелitis equina (Haag-Wackernagel et al., 2004; Vasconcelos et al., 2018; Gibbs et al., 2005; Mansour et al., 2014;).

### **Virus con potencial zoonótico: Influenza aviar y Virus del Nilo Occidental**

Dentro del grupo de enfermedades zoonóticas, las infecciones virales son cada vez más frecuentes y con mayor impacto para la salud pública mundial, al ser los agentes etiológicos de numerosos brotes de en los últimos años (Tomori y Oluwayelu, 2023). Dentro de este grupo, el VIA y el VNO han sido responsables de numerosas muertes entre sus reservorios principales (aves silvestres) y hospederos (aves domésticas y mamíferos) (LaDeau et al. 2007; Blagodatski, et al. 2021). Los virus causantes de influenza son virus RNA que pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, y se diferencian en tres tipos A, B y C, siendo los virus tipo A y B los principales agentes asociados a influenza epidémica en humanos. La influenza aviar es causada por cepas del virus tipo A las cuales se clasifican según sus proteínas de superficie; Hemaglutinina (HA), necesaria para la entrada viral y la Neuraminidasa (NA) que facilita la liberación viral. En términos antigénicos, son las proteínas más variables, reconociéndose a la fecha un total de 18 HA y 11 NA diferentes, que dan origen a los diferentes subtipos de influenza reportados (HxNx) (Webster et al., 1992; De Marco et al., 2023).

Las aves acuáticas migratorias son consideradas como reservorios principales de IA, convirtiéndose de esta forma en la principal fuente de influenza que infectan a otras especies (Webster et al., 1992). El virus IA puede infectar una gran variedad de especies animales, incluyendo otras aves (silvestres o domésticas) cerdos, caballos, mamíferos acuáticos y humanos, transmitiendo el virus a través del contacto directo con aves infectadas, secreciones respiratorias y heces contaminadas (Velázquez et al., 2023).

En el caso de Colombia la presencia de la IA fue reportada por primera vez en Medellín durante el año 2015 (Jiménez-Bluhm et al., 2016) donde de 1160 muestras incluyendo 419 Anseriformes, 624 Galliformes, 15 Columbiformes (*C. livia*) y 102 muestras ambientales, 31

individuos resultaron positivos para la variante H11N2. Entre las especies infectadas hay aves Anseriformes y Galliformes (los ejemplares de *C. livia* resultaron negativos) e incluso se logró identificar mediante análisis filogenéticos, la relación genética con las variantes H11N2 aisladas en Chile durante el 2013 y Estados Unidos durante los años 2010-13 (Jiménez-Bluhm et al., 2016).

En Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) durante los últimos cuatro años ha confirmado como resultado de las acciones de vigilancia epidemiológica que se adelantan en todo el territorio nacional, la ocurrencia de cuatro brotes de influenza aviar altamente patógena en aves de traspatio. El primer brote fue detectado entre octubre y diciembre del 2022, identificando 38 aves infectadas en los departamentos de Córdoba (21/38), Chocó (7/38), Sucre (5/38), Bolívar (4/38) y Magdalena (1/38) (ICA., 2025). Segundo brote entre enero y marzo del 2023, identificando 10 aves infectadas en los departamentos de Nariño (8/10), Córdoba (1/10) y Cauca (1/10) (ICA., 2025). El tercer brote para el mismo año en el mes de julio, identificando 3 aves infectadas en los departamentos de Cauca (2/3) y Córdoba (1/3). Y finalmente, entre octubre y noviembre de 2024 se identificaron 14 aves infectadas en los departamentos de Bolívar (6/14), Magdalena (5/14), Atlántico (2/14) y Nariño (1/14). De las muestras recolectadas se identificó la presencia de virus de influenza aviar altamente patógena A (H5) – Clado 2.3.4.4b (ICA., 2025)

Por otra parte, el VNO es un arbovirus que pertenece a la familia Flaviviridae, de importancia clínica y epidemiológica con representantes como Dengue y Zika (Liang & Dai et al. 2024). Los miembros de la familia Flaviviridae presentan un genoma de ARN de cadena sencilla (monocatenario), con polaridad positiva y un único gen con una longitud aproximada de 11,000 nucleótidos (nt). El VNO presenta un modo de transmisión vectorial mediado por mosquitos del género *Culex* a diferencia del VIA, que puede transmitirse por aerosoles. Sin embargo, un aspecto en común entre ambos virus es su capacidad de ser transmitido desde sus principales reservorios (aves silvestres migratorias (Heidecke et al., 2023)). El VNO ha sido detectado en más de 150 especies de aves silvestres y domésticas pertenecientes a los órdenes Passeriformes, Ciconiformes, Falconiformes, Anseriformes, Columbiformes, y Strigiformes, siendo estos órdenes los más susceptibles al desarrollar altas viremias, lo que permite la transmisión vectorial hacia una gran variedad de hospederos vertebrados (otras aves, mamíferos y reptiles), que el caso del humano a causa de su baja viremia no logren transmitir vectorialmente la el patógeno (Klenk et al., 2004; Habarugira et al., 2020). Desde su identificación en Uganda en

el año 1937 (Smithburn et al., 1940), el VNO ha causado numerosos brotes en África, Asia, Europa y Norte América convirtiendo a este virus en un riesgo de salud pública global (Chancey et al., 2015).

El VNO se detectó por primera vez en Suramérica y Colombia en el 2004 durante una encuesta epidemiológica, llevada a cabo en equinos, realizada en el caribe de Colombia (Córdoba y Sucre) (Mattar et al., 2005). En los años siguientes, más encuestas epidemiológicas fueron realizadas en búsqueda de VNO en otros departamentos de Colombia, identificando antígenos contra VNO en caballos del departamento del Meta y Antioquia (Góez-Rivillas et al., 2010). Siguiendo la hipótesis que VNO se diseminó más eficientemente en las Américas gracias a las aves migratorias portadoras del virus, el Instituto Alexander Von Humboldt llevó a cabo el primer estudio en aves locales y migratorias provenientes de Estados Unidos para detectar VNO mientras cruzaban por las islas de San Andrés y Providencia (Rosselli et al., 2003), con resultados negativos para VNO. Para el año 2012 se determinó la presencia de VNO en 18 flamings infectados en el zoológico de Antioquia (Osorio et al., 2012). A la fecha aún no se ha reportado ningún otro caso de vertebrados infectados con VNO incluyendo a humanos.

Colombia se encuentra en una ruta importante de aves migratorias, las cuales pueden actuar como reservorios de virus como el del Nilo Occidental y la Influenza Aviar. Las aves residentes, como *C. livia*, pueden integrarse al ciclo de transmisión mediante contacto directo con estas especies migratorias o a través de vectores como mosquitos. La interacción estrecha entre la paloma común y seres humanos en entornos urbanos convierte a esta especie en un potencial indicador y transmisor de patógenos zoonóticos. Esta interfaz ave-humano representa un riesgo para la salud pública, la propagación de resistencia antimicrobiana, el bienestar animal, y la conservación de la fauna silvestre. Las ciudades capitales de Colombia, por su alta densidad poblacional y concentración de palomas ferales, constituyen puntos críticos para el monitoreo y vigilancia de patógenos potencialmente zoonóticos (Barbosa Brugés et al., 2020; Cano-Terriza et al., 2015).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de hemoparásitos, parásitos gastrointestinales y virus con potencial zoonótico, específicamente el virus de la Influenza Aviar y el Virus del Nilo Occidental, en *Columba livia* en tres localidades de Colombia.

## **2. Materiales y métodos.**

## **2.1. Captura de individuos**

Durante los meses de marzo y abril del 2024, se realizaron muestreos en Arauca (Arauca), Bogotá (Cundinamarca) y en Aguazul (Casanare). Se identificaron puntos de aglomeración de palomas comunes y se cebaron empleando granos de maíz y pan. Posterior a la agrupación de los individuos alrededor del punto de alimentación fueron capturadas de forma manual (el personal que captura contaba con implementos de bioseguridad), empleando una red de niebla de longitud de 6 y 12 metros y un diámetro de 36 mm que se dejó caer sobre el grupo de aves. Los individuos capturados se transportaban en bolsas de tela de manera individual y regresados a su sitio de captura luego de ser muestreados.

En Arauca las aves fueron capturadas en el parque principal Simón Bolívar (N.7.085318°, W 70.757776°) y en el parque Caldas (N 7.087456°, W 70.757831°). La segunda localidad fue en la ciudad de Bogotá, entre las calles 45 y 53 (N 7.3758, W 74.0413). La tercera localidad fue el municipio de Aguazul, los sitios de muestreo fueron el colegio San Agustín (N 5.167571°, W 72.542351°) y el terminal de transporte (N 5.168812°, W 72.549734°). Las muestras fueron luego trasladadas al laboratorio para su análisis.

## **2.2. Toma de muestras**

Las aves fueron identificadas, fotografiadas y se tomaron las medidas de culmen total, culmen expuesto, alto y ancho del pico a la altura de las narinas, rictus, ala, cola, tarso y masa. Para la búsqueda de hemoparásitos se utilizó punción de la vena braquial para extraer aproximadamente 50 µl de sangre, con la que se elaboraron tres frotis sanguíneos y el restante se almacenó sangre en etanol absoluto. Para la búsqueda de virus se realizó toma de hisopado cloacal y orofaríngeo, una vez retirado el hisopo se introdujo en tubos de criopreservación con DNA/RNA Shield (ZYMO RESERARCH, Cat. No R1200-25, USA). Para la búsqueda de parásitos intestinales, las heces se tomaron de la bolsa donde se transportaba el ave o en la defecación cuando se tomó el hisopado cloacal.

## **2.3. Diagnóstico parasitológico**

Los frotis de sangre fueron secados al aire y fijados en metanol absoluto por cinco minutos el mismo día de su preparación. Posteriormente, fueron coloreados con tinción de Giemsa al 4% por 45 minutos (Matta & Rodríguez 2001). Los frotis se examinaron por microscopía de luz

empleando un microscopio Olympus luz Olympus Bx43 con la cámara digital DP-72 y el software de imágenes Cellsens versión 1.11. Su morfología se comparó con la clave de Valkiūnas y Iezhova (2022) y la intensidad de infección se cuantificó por conteo de células infectadas en 10000 glóbulos rojos.

Para el caso de parásitos intestinales, en una lámina portaobjetos se dispensó una gota de solución salina y una gota de Lugol, sobre cada gota con un palillo de madera se extendió una pequeña porción de heces y se cubrió con laminilla.

## **2.4. Análisis moléculas para la detección de VIA y VNO**

### **2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos a partir de hisopados cloacales y orofaríngeos**

Noventa y seis hisopos (Tabla 1) de los 48 individuos capturados se les extrajeron RNA con el Kit de extracción Quick-DNA/RNA™ MagBead kit (Cat. No. R2130; Zymo Research, CA, USA), de acuerdo con las condiciones del fabricante, resultando en 48 eluidos cloacales y 48 orofaríngeos utilizados para la detección molecular de VIA y VNO.

### **2.4.2 Detección molecular de VIA por RT-qPCR Múltiple por TaqMan**

Para la detección molecular de IAV, dos juegos de primers con sus correspondientes sondas fueron usados. El primer juego (M) Sentido “S” 5'-TGGAAAGTGTAARAAACGGAACGT-3', Anti-sentido “AS” 5' CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG-3' y Sonda 5'-FAM-WCCCCAGGWGGWGGACTG-BHQ1-3' permite la detección de una región específica en la matriz del virus, reconociendo los subtipos de influenza A y B. La segunda pareja o (H5) S 5'-GGAAAGTGTAARAAACGGAACGGAACGT-3', AS 5'-TGCTAGGGAACTCGCMACTG-3' y Sonda 5'-Cy5-ACTCCCCACTTATTCCTCTCTCT-BHQ1-3', permite discriminar se forma específica entre ambos subtipos de influenza en función de la hemaglutinina (HA)-5. Como control endógeno, se usó una pareja de primers (18S dirigidos al hospedero vertebrado) S 5'-GAGCTAATACATGCCGACGAG-3', AS 5'-CTAGAGTCACCAAAGCTGCC-3' y Sonda TaqMan 5'-HEX-CGACCTCCGGGGACG-BHQ1-3', que amplifica un fragmento de 97 pb del gen 18S rRNA del hospedero (Zyrianova & Zaripov, 2022). Como control positivo para el PCR se empleó un vector de clonación pMG-Amp (plásmido) Macrogen Inc. (Seoul, Korea), que contenía las secuencias objetivo de hibridación para los primers y sondas empleadas (Figura Suplementaria 1A). Las condiciones

del montaje de PCR y el perfil térmico empleado para la obtención de productos de amplificación se llevaron a cabo según Cárdenas et al. 2005.

#### **2.4.3 Detección molecular de VNO por RT-qPCR Múltiple por TaqMan**

Para la detección molecular de VNO, los primers y sonda empleados se sintetizaron según (Vasques et al 2016); WNV S 5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3', AS 5'-CGGTWYTGAGGGGGCTTACRTGG-3' y Sonda 5'-FAM-WCCCCAGGWGGGGACTG-BHQ1-3'. Como control positivo para la detección de VNO, se empleó un plásmido (Figura Suplementaria 1B) que contenía las secuencias objetivo de hibridación para VNO y 18S rRNA (Matta et al., 2025). Finalmente, las condiciones del montaje y perfil térmico empleado se llevaron a cabo según (Matta et al., 2025).

#### **2.4.4 Detección molecular de VNO por RT-qPCR Monoplex**

Como una segunda fuente de confirmación de diagnóstico para las muestras identificadas como positivas tras la detección de VNO por RT-qPCR múltiple, se confirmó la positividad mediante RT-qPCR monoplex usando SYBR-Green como sistema de detección. Esta confirmación, se llevó a cabo usando los mismos primers de detección y control endógeno según las condiciones de Matta et al., (2025), Los Primers correspondientes a las secuencias adicionalmente evaluadas, fueron diseñadas en base a la secuencia de referencia NC\_009942.1 West Nile virus lineage 1, disponible NCBI; Para la región NS5, se evaluaron los primers WNV\_500\_19 S 5'-TGCCACTATGCCTACATGGTTC-3' y WNV\_500\_19 AS 5'-TGCGGTACCTAGTGA ACTCTTCT-3', flanqueando la porción más proximal de la NS5 sentido 5'-3' del genoma, WNV\_500\_21 S 5'-TGTTGTGACACCCTCCTTTGTG-3' y WNV\_500\_21 AS 5'-TATGGGTGGTTCTCATCGTGGT-3', flanqueando la porción media de NS5 y WNV\_500\_27 S 5'-TTTTGAGGAGAAAGTCAGGCCG-3' y WNV\_500\_27 AS 5'-CTGGTTGTGCAGAGCAGAAGAT-3', dirigidos hacia la porción más distal de la NS5, que en conjunto abarcan una región de 2714 pb correspondientes con la región no estructural 5 (NS5). Adicionalmente, se evaluaron primers que permitían la detección de secuencias correspondientes a la Cápside viral WNV\_500\_1 S 5'-GCCTGTGTGAGCTGACAAACT-3' y WNV\_500\_1 AS 5'-TACCGTCATCATCACCTTCCCT-3' y la Envoltura viral WNV\_500\_3 S 5'-CCAAGGCCACAAGGTATTTGGT-3' y WNV\_500\_3 AS 5'-GCTTCCTTTGCCAAATAGTCCG-3'. La reacción empleada consistió en 5 µL de Máster

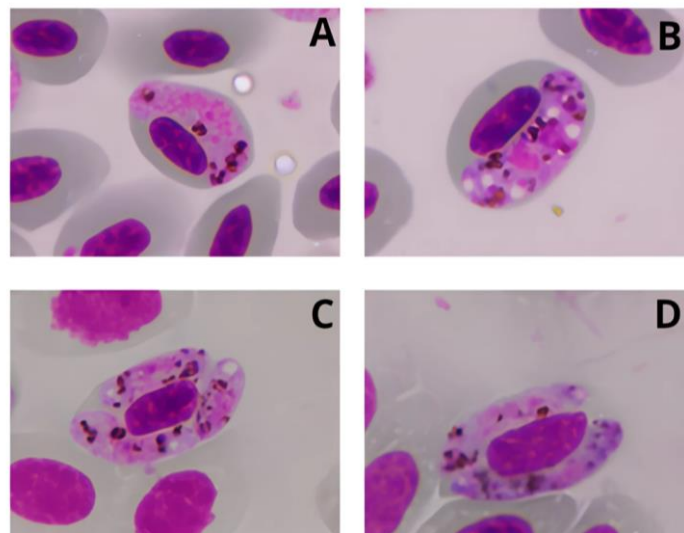
mix, 0.5  $\mu$ M de cada primer para WNV, 1  $\mu$ L de material genético extraído y H<sub>2</sub>O para un volumen final de 10  $\mu$ L. Las condiciones del perfil térmico fueron un paso inicial de transcripción inversa a 55 °C por 2 minutos, denaturación a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C para la hibridación y extensión. Los resultados obtenidos fueron evaluados en función del valor del Delta de Ct (Threshold cycle) y la curva de disociación (Curva Melting) obtenidos en el equipo Quantum Studio 5 (Applied Biosystems) y el programa de análisis Design & Analysis 2.2.0.

### 3. Resultados

#### 3.1 Ocurrencia de parásitos sanguíneos e intensidad de infección

En total se capturaron 48 individuos, las muestras obtenidas están consignadas en la Tabla suplementaria 1. La lectura de los extendidos de sangre reveló la presencia de *Haemoproteus columbae* (Figura 1) en 35/48 individuos, con rangos de parasitemia variable donde a paloma GERPH BO49 presentó la intensidad de infección más alta 23,12% (Tabla 1)

Figura 1. *Haemoproteus columbae* en paloma común (*Columba livia*). A: microgametocito. B: macrogametocito. C: doble infección con microgametocitos. D: doble infección con microgametocito y macrogametocito.



#### 3.2 Enteroparásitos

Para la ciudad de Arauca se analizaron un total de 17 individuos y se encontró una frecuencia de infección por enteroparásitos del 100%. Dentro de los cuales se encuentran *Eimeria* sp.

(64,70%), Eimeriidae (17,64%), levaduras (11,76%), *Blastocystis* (5,90%) Oxyuridae (5,88%) (Figura 2). Por su parte en la ciudad de Bogotá los enteroparásitos ocurrieron en el 86% (12/14) de los casos y se encontraron huevos de helmintos principalmente Ascarididae (21,4%), Capillariidae (7,14%), Strongylida (7,14%), y Spirurida (7,14%). También fueron observados ooquistes de protozoos como *Eimeria* sp. (28,6%) y *Blastocystis* sp. (7,14%). Por último, la presencia de levaduras fue del 57,1% (Figura 2). La infección por helmintos y *Blastocystis* sp. Por su parte, en las muestras analizadas en la ciudad de Aguazul no se observaron parásitos gastrointestinales. Los resultados obtenidos por localidad se consignan en la Tabla 1.

Figura 2. Enteroparásitos hallados en muestras fecales de *Coloma livia* analizadas en el presente estudio. A-C. Huevos de Ascarididae; D, Huevo de Capillaria; E, Huevo de Oxyuridae; F, Levaduras; G, H, I, Ooquistes de *Eimeria* spp. Barra: 20µm.

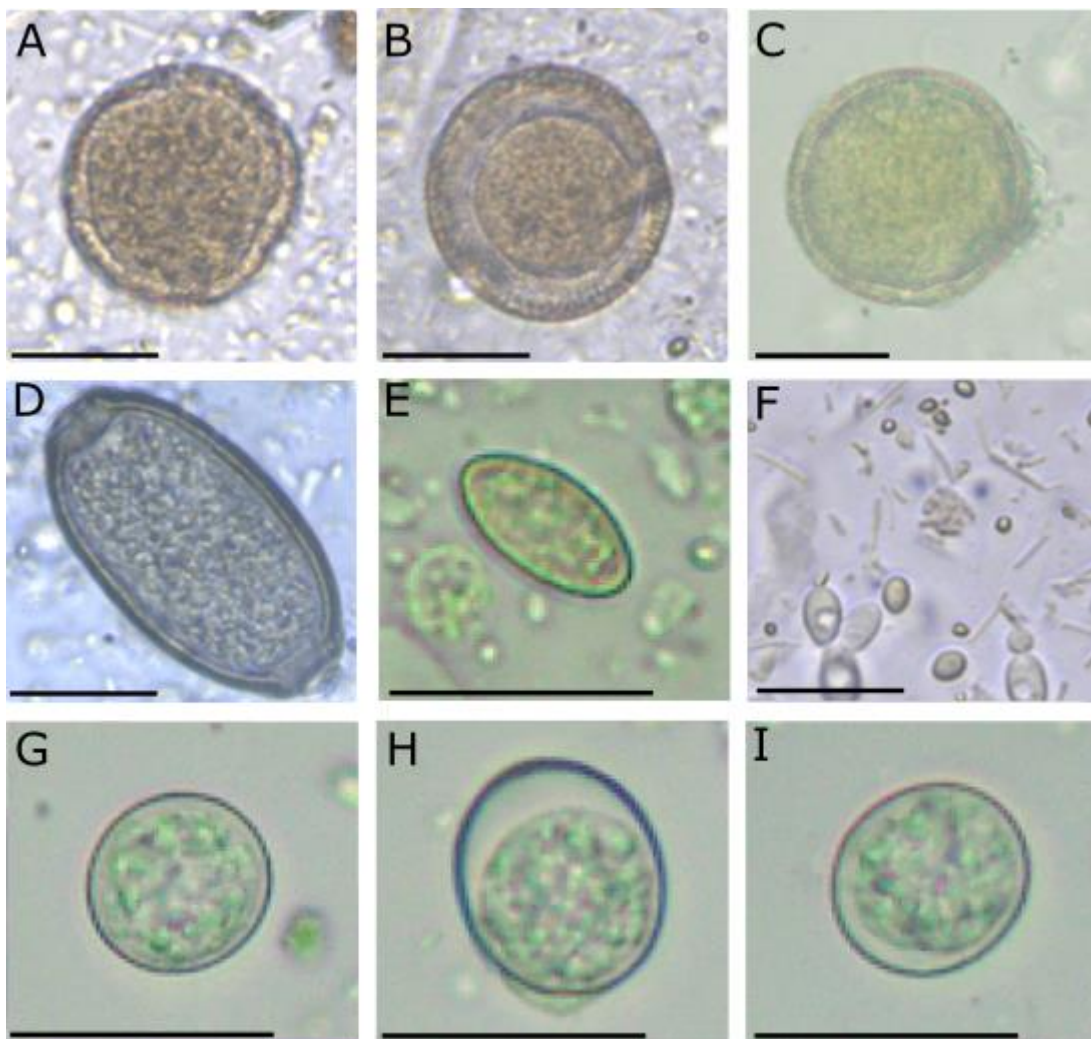


Tabla 1. Número de individuos *Columba livia* muestreados en tres ciudades de Colombia, su positividad para parásitos sanguíneos, con rango de parasitemia en el porcentaje de células infectadas en 10000 eritrocitos, y enteroparásitos.

Localidad	N	Parásitos sanguíneos			Enteroparásitos	
		Infectados	% Infectados	Rango parasitemias	Infectados	% Infectados
Aguazul	17	9	52,9	0 - 0,98	0	0
Arauca	17	12	70,5	0 - 1,02	17	100
Bogotá	14	14	100	0,05 - 23,12	12	85,7
Total	48	35	72,9	0 - 23,12	29	60,41

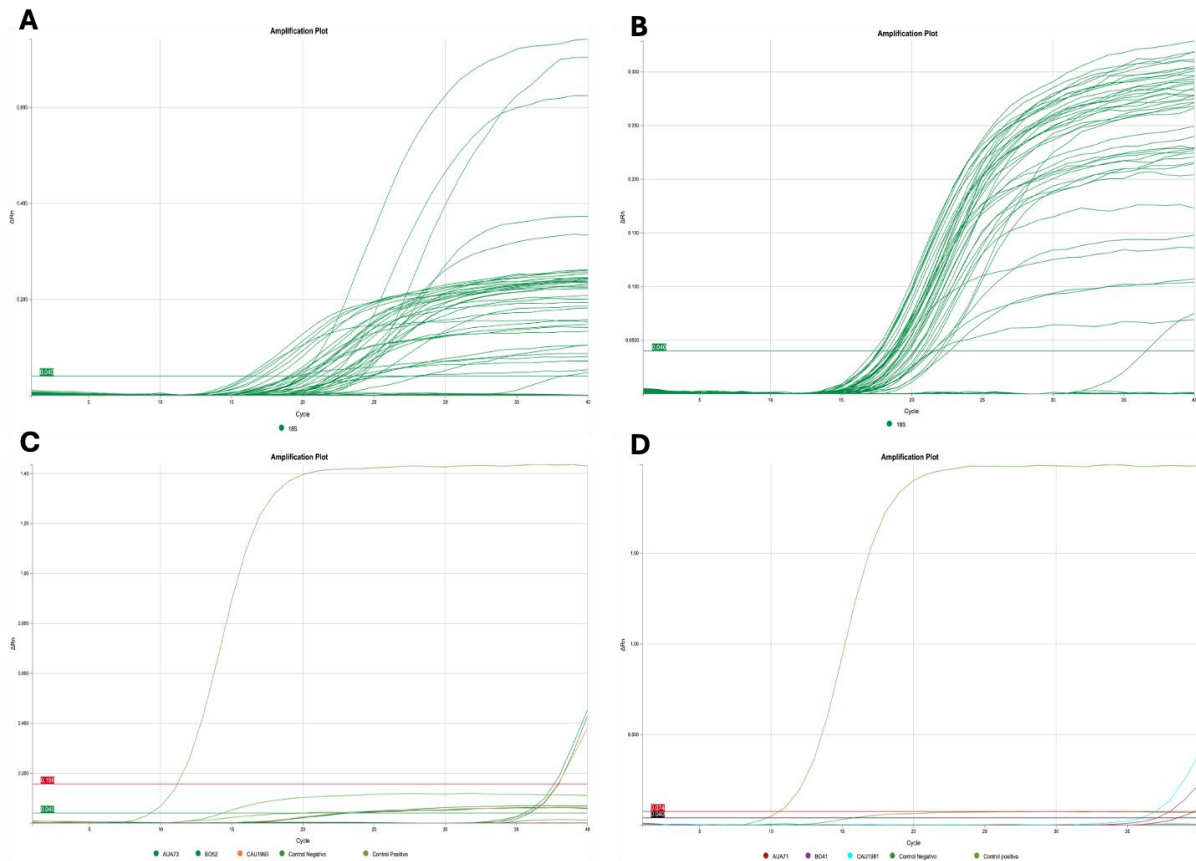
### 3.3 Detección molecular de VIA por RT-qPCR múltiple

La detección molecular y subsecuente análisis de los genes M y H5, revelaron productos de amplificación para el gen M en tres de los 48 eluidos evaluados provenientes de los hisopos orofaríngeos y cloacales procesados resultados consignados en la Tabla 2. Cada muestra con producto de amplificación positivo de hisopos orofaríngeos provenía una de cada localidad: Arauca (AUA 73, Ct = 37,605), Agua Azul, Casanare (CA 1993, Ct = 37,568), y Bogotá (BO 52, Ct = 37,329), Figura 3C. De igual forma para los hisopos cloacales en Arauca (AUA 71, Ct = 39,714), Casanare (CA 1981, Ct = 37,014), y Bogotá (BO 41, Ct = 38,000), Figura 3D. Sin embargo, ninguna de las muestras cumplió con el criterio de inclusión de tener un valor de Ct (valor de umbral de ciclo) menor a 37, por lo que no pueden considerarse producto del qPCR realmente positivos para la presencia del virus (Figura 3). Por otra parte, no se obtuvieron productos de amplificación para el gen H5 en ninguno de los eluidos evaluados, y los controles positivos (Control endógeno del hospedero) y el plásmido con la secuencia viral amplificaron según lo esperado y el control negativo de reacción, no indico contaminación.

Tabla 2. Resultados de la detección molecular de virus potencialmente zoonóticos. Se muestran localidad código de muestreo y el Ct para el control endógeno 18S, para el gen (M) del Virus de la Influenza Aviar (VIA) y para el fragmento de (NC3') del Virus del Nilo occidental (VNO), a partir de hisopados orofaríngeos y cloacales.

Localidad	Código	Hisopado Orofaríngeo			Hisopado Cloacal		
		18S	VIA	VNO	18S	VIA	VNO
Aguazul	AUA 71	22,134	NA	NA	21,524	39,714	NA
	AUA 73	22,134	37,605	NA	21,524	NA	NA
Casanare	CA 1981	19,296	NA	34,190	18,124	37,714	NA
	CA 1983	18,488	NA	36,967	16,595	NA	NA
	CA 1984	17,954	NA	35,467	19,640	NA	NA
	CA 1985	18,830	NA	35,899	23,650	NA	NA
	CA 1986	19,058	NA	37,245	27,238	NA	NA
	CA 1991	17,662	NA	35,946	19,441	NA	NA
	CA 1992	17,396	NA	35,617	21,951	NA	NA
	CA 1993	23,315	37,568	35,531	21,251	NA	NA
Bogotá	BO 41	17,769	NA	34,832	20,321	38,000	NA
	BO 42	17,766	NA	33,972	19,035	NA	NA
	BO 44	24,103	NA	34,474	23,598	NA	NA
	BO 48	18,696	NA	34,684	22,684	NA	35,908
	BO 49	19,645	NA	33,003	19,154	NA	34,159
	BO 50	19,519	NA	33,561	22,851	NA	33,881
	BO 51	19,349	NA	33,579	24,119	NA	34,422
	BO 52	18,318	37,329	34,100	19,888	NA	NA
	BO 53	21,956	NA	36,017	22,029	NA	NA
	BO 54	19,814	NA	35,573	24,097	NA	NA
Controles	Positivo	20,568	10,937	21,715	20,826	11,362	22,321
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Figura 3. Amplificación en escala lineal para la detección de Virus de Influenza Aviar VIA. A-B. Control endógeno 18S rRNA para los 48 hisopos orofaríngeos y cloacales, respectivamente. C-D: amplificación de los genes objetivo M; En C se muestran amplificados con elevación de la curva y Ct para el gen M como sigue: Hisopos orofaríngeos Arauca (AUA 73, Ct = 37.605), Casanare (CA 1993, Ct = 37.568), Bogotá (BO 52, Ct = 37.329) y Control positivo (M Ct = 10,937 y H5 Ct = 14,382) y D. Hisopos cloacales en; Arauca (AUA 71, Ct = 39.714), Casanare (CA 1981, Ct = 37.014), Bogotá (BO 41, Ct = 38.000) y Control Positivo (M Ct = 11,362 y H5 Ct = 13,510).

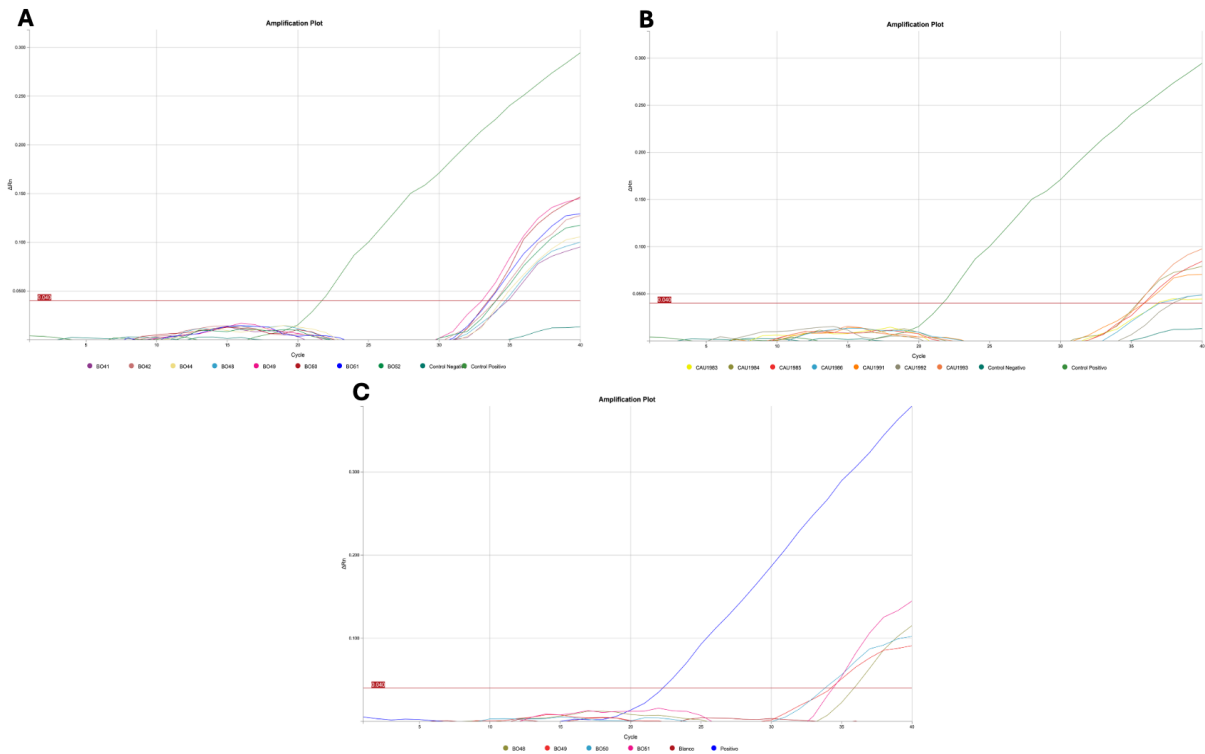


### 3.4 Detección molecular de VNO con la metodología TaqMan

Para los eluidos orofaríngeos de *C. livia* procesados por qPCR se utilizó como criterio de inclusión, un valor de Ct menor a 38 para considerar una muestra positiva para la presencia de VNO. De los 48 eluidos fue posible identificar un total de 18 (37,5%) que cumplieron este criterio, como se reporta en la Tabla 3. Estos eluidos correspondían principalmente de Bogotá con un 71,4% (10/14), con valores de Ct entre 33,003 y 36,017, Figura 4A. La segunda frecuencia más alta observada fue en Casanare con 47,0% (8/17) de muestras positivas y valores de Ct entre 34,190 y 37,245 Figura 4B. Para la localidad de Arauca, ninguna muestra procesada resultó positiva. Tras la evaluación de los 48 eluidos cloacales bajo el mismo criterio de inclusión, se identificaron 4 eluidos positivos con una frecuencia de 8,3% (4/48), todos ellos en la localidad de Bogotá con valores de Ct entre 33,881 y 35,908, Figure 4C. Los controles positivos (Control endógeno del hospedero) y el plásmido con la secuencia viral amplificaron según los esperado y el control negativo de reacción, no indico contaminación.

Figura 4. Curvas de amplificación en escala lineal para la detección de Virus del Nilo Occidental VNO; A. Muestras procesadas a partir de Hisopos orofaríngeos de Bogotá; BO

41 (Ct= 34,832), BO 42 (Ct= 33,972), BO 44 (Ct= 34,474), BO 48 (Ct= 34,684), BO 49 (Ct= 33,003), BO 50 (Ct=33,561), BO 51 (Ct= 33,579), BO52 (Ct= 34,100). B. Muestras procesadas a partir de Hisopos orofaríngeos de Casanare; CA 1981 (Ct= 34,190), CA 1983 (Ct= 36,967), CA 1984 (Ct= 35,467), CA 1985 (Ct= 35,894), CA 1986 (Ct= 37,245), CA 1991 (Ct= 35,946) CA 1992 (Ct= 35,617), CA 1993 (Ct= 35,531) y Control Positivo (WNV Ct = 21,715). C. Muestras procesadas a partir de Hisopos cloacales de Bogotá; BO 48 (Ct= 35,908), BO 49 (Ct= 34,159), BO 50 (Ct= 33,881), BO 51 (Ct= 34,422) y Control Positivo (WNV Ct = 22,3621).



### 3.3 Corroboración molecular por RT-qPCR por SYBR-Green de VNO

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante la detección por RT-qPCR múltiple para VNO, se tomaron los eluidos provenientes de los hisopos orofaríngeos que resultaron positivos tras la detección inicial y se realizó un segundo procedimiento para para confirmar el estatus de positivo. Cada eluido fue evaluado mediante RT-qPCR usando SYBR-Green como sistema de detección, evaluando los productos de amplificación y las curvas de fusión. Inicialmente, con los primers (WNV- Sentido y Anti-sentido) empleados para la detección (Figura suplementaria 2). Posteriormente, se evaluaron los demás juegos de primers que reconocían secuencias de la cápsida, envoltura (Figura suplementaria 3) y región NS5 (Figura suplementaria 4) dentro del genoma completo de VNO. El análisis de los productos de amplificación y curvas de fusión obtenidos por SYBR-Green, indica ausencia de productos de

amplificación específicos para los diferentes juegos de primers empleados y curvas de fusión incongruentes con los productos de amplificación específicos.

#### **4. Discusión**

*Columba livia* es una especie introducida en el Neotrópico incluyendo Colombia, y se caracteriza por tener una relación sinantrópica que puede representar un riesgo de infección por microorganismos de impacto negativo para la salud pública. Esta es la primera investigación que además de analizar la ocurrencia de parásitos, evalúa la presencia de posibles virus con potencial zoonótico en tres localidades de Colombia. Nuestros resultados muestran que las palomas *C. livia* no son portadoras de los virus VIA o VNO en las localidades analizadas en Colombia entre abril y mayo de 2024; pero si presentan altas ocurrencias de endoparásitos y hemoparásitos como se ha reportado previamente (Coral et al., 2015; Saborido., 2009; González-Acuña et al., 2007).

Es importante resaltar que las pruebas dirigidas para detectar VIA y VNO buscaban la presencia de RNA viral como tal, no sus anticuerpos, por tanto, la no detección en las muestras analizadas no descarta contacto previo con estos virus. Este diagnóstico es un reto, dadas las características específicas de la infección viral como: su corto periodo de infección activa, alta labilidad del material genético y las bajas viremias (Vilibic-Cavlek et al., 2024). Específicamente hablando del diagnóstico de VNO, la metodología TaqMan indico positividad, pero este resultado no fue corroborado con la metodología SYBR-Green, por lo que la lectura de estos resultados iniciales fue considerada falsos positivos. El sistema TaqMan ha sido ampliamente utilizado y se reportan varias ventajas en la detección de VNO que incluyen: mayor sensibilidad, mayor rendimiento, mayor reproducibilidad y una mejor cuantificación ( $\leq 0,1$  PFU/ml) frente al RT-PCR de punto final u otros sistemas de detección, que resultaron 1000 veces (10 PFU/ml) menos sensible en la detección de VNO a partir de muestras en vectores o 100 veces (1 PFU/ml) en muestras humanas y tejidos animales (Lanciotti et al., 2000). Sin embargo, su especificidad está estrechamente asociada a la secuencia génica objetivo observándose previamente como al amplificar secuencias asociadas a regiones no codificantes como 3'NC, puede detectar potencialmente cualquier linaje de VNO, en comparación con la amplificación de secuencias codificantes como el gen de la envoltura, que favorece principalmente la identificación de un linaje específico (Vilibic-Cavlek et al., 2024, Lanciotti et al., 2000). Con el fin de establecer

inequívocamente una muestra como positiva y de esta forma evitar la aparición de falso-negativos o falsos-positivos (menos frecuentes), el resultado de una muestra se interpreta como positiva si el valor de Ct es  $\leq 37$  y dos o más veces mayor al valor del control negativo, si la muestra no cumple con uno de los criterios, la muestra se interpreta como inconclusa (Lanciotti et al., 2001). Sin embargo, muestras que por TaqMan fueron interpretadas como positivas pueden ser interpretadas negativas por otras técnicas como Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos (Nucleic acid sequence-based amplification-NASBA) técnica basada en un sistema de detección por Beacon (Lanciotti et al., 2001), haciendo evidente que, a pesar de sus ventajas, puede ser susceptible a errores de interpretación. Una alternativa viable y más económica que permite confirmar un resultado obtenido por sistemas de hibridación (TaqMan o Beacon), es el uso de reactivos intercalantes como SYBR-Green el cual ofrece rango de detección similar ( $\leq 0.1$  PFU/ml) a TaqMan, y al usar un panel de primers similares o idénticos, esta alternativa ofrece la ventaja adicional de evaluar la especificidad según la comparación entre temperaturas de fusión o disociación ( $T_m$ ) para los diferentes productos de amplificación entre las diferentes muestras y el control positivo (Papin et al., 2004).

Dados nuestros resultados, es importante llamar la atención sobre la cuidadosa interpretación de los resultados de RT-qPCR con Ct altos (amplificación en ciclos tardíos). Recomendamos emplear más de un sistema de detección molecular que nos permita confirmar los resultados obtenidos (Figura 2, 3). Así cómo es posible obtener resultados falsos negativos en la prueba de RT-qPCR (Papin et al., 2004). También es importante discutir y analizar con cautela Ct tardíos, como los obtenidos en este estudio.

En Italia como parte del programa de vigilancia epidemiológica de VNO se realizaron infecciones experimentales con linajes de VNO en varias especies de aves, entre ellas *C. livia*. Encontrando que, a pesar de altas viremias, las palomas no mostraban síntomas. Los análisis histopatológicos mostraron miocarditis (Spedicato et al., 2016). En concordancia con lo reportado por (Komar et al., 2003). Los resultados experimentales obtenidos por Spedicato, 2016 mostraron que las *C. livia* bajo ciertas circunstancias pueden llegar a ser reservorios competentes de VNO, al identificar una dinámica de infección con un pico de replicación viral cuatro d.p.i con valores de Ct = 32,5 aprox. frente a los valores de Ct observados tres d.p.i o cinco d.p.i (37,5 y 40, respectivamente). Implicando que, durante un periodo muy breve de tiempo, las palomas pueden llegar a transmitir vectorialmente VNO

Por su parte Mansour et al (2014) reportan el análisis de palomas naturalmente infectadas con H5N1 y el virus aislado provocó la muerte en embriones 3 dpi. Las palomas mostraron diarrea y manifestaciones nerviosas y muerte súbita 10 días después del inicio de los síntomas. En la necropsia mostraron congestión interna de pulmón y cerebro. En Brasil se tiene registro de la circulación de anticuerpos contra arbovirus incluido el VNO en palomas comunes ferales (Ramos et al., 2017).

En estudios realizados principalmente durante las dos décadas pasadas, se evaluó la interacción entre VNO y *C. livia*, con el fin de caracterizar su papel como hospedero o reservorio competente para VNO. Con base en un estudio llevado a cabo por (Komar et al., 2001) identificó que las palomas comunes presentaron entre un 3% a 16% de ocurrencia de infección por VNO durante los brotes ocurridos en 1999 en Estados Unidos, catalogado estos valores como poco significativos e incompetentes como reservorios frente a otras especies como “House Sparrows” (*Passer domesticus*). Posteriormente, (Komar et al., 2003) indujo una infección con la cepa NY-1999 en *C. livia* confirmado la presencia de antígenos neutralizantes en respuesta al VNO durante nueve semanas después de la inducción de la infección. Sin embargo, esta respuesta se consideró un respuesta temprana y efímera caracterizada por un patrón relativamente corto entre la detección de IgM que aumentó pronto y cayó con la misma prontitud, para posteriormente desarrollar una seroconversión a IgG identificable durante el periodo del ensayo. A pesar de las implicaciones de estos resultados, se sugiere el uso a las palomas comunes como una posible especie centinela para la vigilancia de VNO en áreas de transmisión urbanas (Komar et al., 2003; Kim et al., 2016). Dentro de las características generales para considerar una especie centinela; la paloma ha evidenciado una susceptibilidad a la infección uniforme, es resistente a la infección y muestra la capacidad para desarrollar una respuesta inmune rápidamente detectable, que a su vez no contribuye de forma significativa con el ciclo de transmisión local (Komar et al., 2001). Por otra parte, la validación de la paloma como especie de interés como centinela para VNO se ha propuesto en Estados Unidos y Europa, con rangos de seroprevalencias entre 0% a 57%, en diferentes países europeos, en los cuales, las palomas son de interés para la vigilancia de VNO, en comparación a su implementación como centinelas para otros virus zoonóticos como VIA, a causa de la baja respuesta inmune detectada y su caracterización como hospedero de punto final o “dead end” (Cano-Terriza et al., 2015).

Dentro de las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo del virus y de la infección en el insecto vector, se reportan las altas temperaturas con bajas precipitaciones (Danforth et al. 2016; Lorenz et al., 2022). Esta condición de temperatura no se cumple actualmente para la ciudad de Bogotá, que pudiera estar restringiendo la propagación del VNO, pues la temperatura promedio es 18°C, pero ocurren en las otras dos localidades analizadas.

Con relación a parásitos intestinales, estudios realizados en la ciudad de Bogotá se ha reportado la presencia de *Cryptosporidium* spp. en palomas en vida feral (Martínez Ramírez et al., 2021). El presente estudio no descarta la presencia de este parásito dado que, para la identificación de éstos, se emplean otros métodos diferentes a los enunciados en la sección de metodología. Por su parte, un estudio realizado en la plaza de Bolívar de Bogotá encontró la mayor prevalencia por *Eimeria* spp., lo cual para el presente estudio constituye la segunda infección más prevalente en los individuos muestreados. De igual forma, la prevalencia de capiláridos es congruente con lo reportado en el mismo estudio donde se evidencia menor ocurrencia de infección por estos helmintos (Uribe Molina & Silva Florez., 2021).

En este estudio el enteroparásito encontrado con mayor frecuencia en las palomas es del género *Eimeria* spp. con una ocurrencia en el departamento de Arauca de 64,70% y Bogotá con 28,6% (Tabla 1). En el caso de la ocurrencia del género en el departamento de Arauca, es mayor a la reportada en Envigado por Pérez-García et al (2015) del 55% y (Uribe Molina & Silva Flórez., 2021) del 49,3%; pero menor a la identificada en Villavicencio, en donde la ocurrencia fue del 1,4% (Hernández-Martínez et al., 2021). La presencia de parásitos gastrointestinales en palomas genera alteraciones clínicas, como: la pérdida de colores, una apariencia de mala calidad de la pluma, pérdida de peso, afectación en la reproducción con disminución de la puesta de huevos (Parsani et al.,2014).

Adicionalmente, otros de los enteroparásitos encontrados fueron ascáridios y capiláridos en la ciudad de Bogotá. Previamente Uribe Molina & Silva Flórez (2021) revela la presencia del género *Capillaria* en palomas *C. livia* presentes en la Plaza de Bolívar de la ciudad de Bogotá con una ocurrencia del 21,3%, la cual es mayor a la identificada en el presente estudio.

*Haemoproteus columbae* es el hemoparásito más comúnmente identificado en *C. livia* a nivel global, con reportes de alta prevalencia en diferentes regiones, es así como en n Ciudad del Cabo, Sudáfrica se encontró una prevalencia del 96,9 %, (Nebel et al., 2020), del 100% en Sao

Paulo, Brasil (Chagas et al., 2016). En Colombia, estudios previos ya habían documentado su presencia (Coral et al., 2015; Cepeda et al., 2019; Hernández-Martínez et al., 2021). Casos particulares de nuestro estudio con alta carga parasitaria, como el individuo BO 52 con una parasitemia del 12% y coinfección con levaduras, lo cual podría sugerir un compromiso inmunológico. Otro caso de resaltar es el individuo B049, presentó una parasitemia del 23,1%. Estudios previos han reportado que incluso altas parasitemias por *H. columbae* no se asocian necesariamente con alteraciones conductuales o deterioro en el estado general de salud de *C. livia* (Coral et al., 2015; Cepeda et al., 2019). Sin embargo, los análisis histopatológicos si muestran compromiso de diversos órganos (Cepeda et al., 2019).

Las diferencias en la prevalencia de coinfecciones entre regiones podrían estar relacionadas con factores ecológicos, o exposición a agroquímicos que pudiera modular la presencia de parásitos intestinales como en el caso de Aguazul donde dieron resultados negativos para enteroparásitos, aunque esto no concuerde con lo reportado en literatura. Es importante resaltar que Aguazul se ubica en el departamento de Casanare, primer productor de arroz a nivel nacional (Fedearroz y Dane, 2023 2da). Lo que implica el uso intensivo de agroquímicos en los cultivos. Reportes de las afectaciones del uso de estos productos en el cultivo de arroz incluyen microorganismos del suelo, pero no de las afectaciones a los animales (Bedoya & Moreno., 2013). En los productos usados en la agricultura está el “friponil”, un insecticida que se encuentra en soluciones concentradas se reportó que para *C. livia* se considera “prácticamente no tóxico” (Gómez et al., 2023). Es posible que el uso de estos productos afecte el ciclo de vida de los parásitos intestinales debido a alteraciones en la microbiota intestinal, causadas por productos químicos lo que ocasiona cambios en el metabolismo, la inmunidad y la función neurológica de animales y humanos (Chiu et al., 2020; Vargas et al., 2024). La posibilidad de que el uso frecuente de estos productos contribuya a la ausencia de parásitos intestinales en la población de palomas de Aguazul merece ser explorada mediante estudios más detallados

## **Conclusiones**

Nuestro estudio demuestra que *C. livia* juega un papel relevante en el mantenimiento de enteroparásitos en Arauca y Cundinamarca, la ausencia de éstos en Aguazul llama especialmente la atención, y pudiera ser foco de estudio para determinar agentes externos que pudieran explicar este hallazgo. Se corrobora la alta frecuencia del hemoparásito *H. columbae*.

Las poblaciones de *C. livia* analizadas en las tres localidades no mostraron positividad para la presencia activa de VIA o VNO, pero no descarta infecciones pasadas. La amplia distribución y densidad poblacional de *C. livia* en ambientes urbanos, sumada a su potencial de interacción con otras especies de aves, puede representar un factor de riesgo para que patógenos infecten la paloma doméstica y posteriormente ser transmitidos a otras especies. De tal manera que programas constantes de vigilancia deben ser implementados en el país. Se sugiere la ampliación del muestreo a otras regiones de Colombia que presenten diferentes altitudes y temperaturas promedio, así como la incorporación de técnicas diagnósticas específicas para *Cryptosporidium*, un parásito zoonótico de relevancia. Además, se considera ideal complementar el estudio con análisis serológicos que permitan detectar la presencia de anticuerpos frente a VIA y VNO en palomas domésticas.

### **Agradecimientos**

Agradecemos a los miembros del grupo GERPH, especialmente a María Fernando Medina y Alejandra Geraldin Quiroz Delgado y Mónica Sofia Martin Sánchez. Este proyecto fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia, bajo el proyecto con código Hermes 60104.

### **Contribuciones de Autores**

Conceptualización MNE, AFAG, JAB, ADG LJCH; Muestreo: MNE, MNE, AFAG, JAB, ADG, BAG, LMPA, Metodología: MNE, FAG, ADG; Análisis: MNE, AFAG, JAB, ADG, FAG, BAG, LMPA; Adquisición de financiación: MNE, AFAG, JAB, ADG, LJCH; Administración del proyecto: MNE, LMPA; Validación: FAG, MNE; Visualización: FAG; LMPA; BAG; Escribir versión borrador: MNE, FAG, LMPA; Revisión y edición: MNE, AFAG, JAB, ADG; BAG, LMPA, FAG, LJCH. Supervisión del proyecto MNE.

### **Conflicto de intereses.**

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses que declarar.

### **Referencias bibliográficas**

Barbosa-Brugés P.A., Acero-Plazas V. M., Arenas N. E. (2021). Presencia de *Escherichia coli* con resistencia extendida a los antibióticos en paloma doméstica (*Columba livia*) en una localidad

de Bogotá, Colombia. Revista de Ciencias agropecuarias, 26(2), 21-30.  
<https://doi.org/10.36436/24223484.312>

Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S.-J., Park, H., & Volchkov, P. (2021). Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens*, 10(5), 630. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050630>

Cano-Terriza D, Guerra R, Lecollinet S, Cerdà-Cuéllar M, Cabezón O, Almería S, García-Bocanegra I. Epidemiological survey of zoonotic pathogens in feral pigeons (*Columba livia* var. *domestica*) and sympatric zoo species in Southern Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015 Dec; 43:22-7. doi: 10.1016/j.cimid.2015.10.003. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26616657.

Cárdenas Parra A.K., Barón Vera J. P., Calixto-Botía I.F., Matta N.E., Rodríguez-Fandiño O. A, Correa-Higuera L.J. A (2025) Broad Wildlife Survey of Influenza A Virus in the Orinoco Flooded Savannas from Colombia: New Reports and Perspectives. *Animals*, In press

Cepeda, A. S., Lotta-Arévalo, I. A., Pinto-Osorio, D. F., Macías-Zacipa, J., Valkiūnas, G., Barato, P., & Matta, N. E. (2019). Experimental characterization of the complete life cycle of *Haemoproteus columbae*, with a description of a natural host-parasite system used to study this infection. *International Journal for Parasitology*, 49(12), 975-984. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.07.003>

Chagas, C. R. F., Guimarães, L. de O., Monteiro, E. F., Valkiūnas, G., Katayama, M. V., Santos, S. V., Guida, F. J. V., Simões, R. F., & Kirchgatter, K. (2016). Hemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil. *Parasitology Research*, 115(4), 1443-1452. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4878-0>

Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., & Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International*, 2015, 376230. <https://doi.org/10.1155/2015/376230>

Chaves-Bedoya, Giovanni, Ortíz-Moreno, Martha Lucia, & Ortiz-Rojas, Luz Yineth. (2013). Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *Acta Agronómica*, 62(1), 66-72.

Chiu, K., Warner, G., Nowak, R. A., Flaws, J. A., & Mei, W. (2020). The Impact of Environmental Chemicals on the Gut Microbiome. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 176(2), 253-284. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa065>

Chomel BB. Zoonoses. *Encyclopedia of Microbiology*. 2009:820–9. doi: 10.1016/B978-012373944-5.00213-3. Epub 2009 Feb 17. PMID: PMC7149995.

Coral, A. A., Valkiūnas, G., González, A. D., & Matta, N. E. (2015). In vitro development of *Haemoproteus columbae* (*Haemosporida: Haemoproteidae*), with perspectives for genomic studies of avian haemosporidian parasites. *Experimental Parasitology*, 157, 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.003>

Danforth, M. E., Reisen, W. K., & Barker, C. M. (2016). The Impact of Cycling Temperature on the Transmission of West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology*, 53(3), 681-686. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw013>

De Marco, M. A., Delogu, M., & Cotti, C. (2023). Special Issue “Ecology of Influenza A Viruses”: Editorial. *Microorganisms*, 11, 1287. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051287>

Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ) (2023). Boletín quinto censo nacional de arroceros 2023: segunda entrega. <https://www.dane.gov.co/files/operaciones/CNA/bol-5toCNA-2daEntrega-2023.pdf>

Gibbs, S. E. J., Hoffman, D. M., Stark, L. M., Marlenee, N. L., Blitvich, B. J., Beaty, B. J., & Stallknecht, D. E. (2005). Persistence of Antibodies to West Nile Virus in Naturally Infected Rock Pigeons (*Columba livia*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(5), 665-667. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.5.665-667.2005>

Góez-Rivillas, Y., Taborda, N., Díaz, F. J., Góngora, A., Rodas, J. D., Ruiz-Sáenz, J., & Osorio, J. E. (2010). Antibodies to West Nile virus in equines of Antioquia and Meta, Colombia, 2005-2008. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(4), 462-470.

Gómez-Beltrán, D. A., Montes, J. E. P., Villarl, D., Gómez-Beltrán, D. A., Montes, J. E. P., & Villarl, D. (2023). Impacto ecológico del insecticida fipronil: Valoración de riesgos en humanos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 70(1), 65-84. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v70n1.100631>

González-Acuña, D., Silva G, F., Moreno S, L., Cerda L, F., Donoso E, S., Cabello C, J., & López M, J. (2007). Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. *Revista chilena de infectología*, 24(3), 199-203. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182007000300004>

Haag-Wackernagel, D., & Moch, H. (2004). Health hazards posed by feral pigeons. *The Journal of Infection*, 48(4), 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2003.11.001>

Habarugira, G., Moran, J., Colmant, A. M. G., Davis, S. S., O'Brien, C. A., Hall-Mendelin, S., McMahon, J., Hewitson, G., Nair, N., Barcelon, J., Suen, W. W., Melville, L., Hobson-Peters, J., Hall, R. A., Isberg, S. R., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2020). Mosquito-Independent Transmission of West Nile virus in Farmed Saltwater Crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Viruses*, 12(2), 198. <https://doi.org/10.3390/v12020198>

Heidecke J, Lavarello Schettini A, Rocklov J (2023) West Nile virus eco-epidemiology and climate change. *PLOS Clim* 2(5): e0000129. <https://doi.org/10.1371/journal.pclm.0000129>

Hernández-Martínez, M., Parra, J., Gongora, A., Walteros-Casas, H., & Chaparro Gutiérrez, J. (2021). Identificación de ecto y endoparásitos en palomas domésticas (*Columba livia*) del área urbana de Villavicencio, Meta, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 26, e2157. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2157>

Instituto Colombia Agropecuario (ICA). Influenza Aviar.

<https://www.ica.gov.co/getdoc/9cde2d77-673f-4225-9990-d67593ab4f36/influenza-aviar.aspx>

Jiménez-Bluhm, P., Karlsson, E. A., Ciuderis, K. A., Cortez, V., Marvin, S. A., Hamilton-West, C., Schultz-Cherry, S., & Osorio, J. E. (2016). Avian H11 influenza virus isolated from domestic poultry in a Colombian live animal market. *Emerging Microbes & Infections*, 5(12), e121. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.121>

Kim CY, Oh H, Song J, Hur M, Suh JH, Jheong WH, Kim JT, Oh HS, Park JH. First detection of West Nile virus in domestic pigeon in Korea. *J Vet Sci*. 2016 Dec 30;17(4):587-589. doi: 10.4142/jvs.2016.17.4.587. PMID: 27030190.

Klenk, K., Snow, J., Morgan, K., Bowen, R., Stephens, M., Foster, F., Gordy, P., Beckett, S., Komar,

- N., Gubler, D., & Bunning, M. (2004). Alligators as West Nile Virus Amplifiers. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2150-2155. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040264>
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., & Bunning, M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 311-322. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020628>
- Komar, N., Panella, N., Burns, J., Dusza, S., Mascarenhas, T., & Talbot, T. (2001). Serologic Evidence for West Nile Virus Infection in Birds in the New York City Vicinity During an Outbreak in 1999. *Emerging infectious diseases*, 7, 621-625. <https://doi.org/10.3201/eid0704.010403>
- Kozdruń, W., Czekaj, H., & Stys, N. (2015). Avian zoonoses—A review. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59, 171-178. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0026>
- Lanciotti, R. S., & Kerst, A. J. (2001). Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4506-4513. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4506-4513.2001>
- Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., Komar, N., Panella, N. A., Allen, B. C., Volpe, K. E., Davis, B. S., & Roehrig, J. T. (2000). Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4066-4071. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4066-4071.2000>
- LaDeauSL, Kilpatrick A.M., MarraP.P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature*. 2007; 447: 710–713. <https://doi.org/10.1038/nature05829>

- Liang, Y., & Dai, X. (2024). The global incidence and trends of three common flavivirus infections (Dengue, yellow fever, and Zika) from 2011 to 2021. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1458166. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1458166>
- Lorenz, C., de Azevedo, T. S., & Chiaravalloti-Neto, F. (2022). Impact of climate change on West Nile virus distribution in South America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *116*(11), 1043-1053. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trac044>
- Mansour, S. M. G., ElBakrey, R. M., Ali, H., Knudsen, D. E. B., & Eid, A. A. M. (2014). Natural infection with highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in domestic pigeons (*Columba livia*) in Egypt. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, *43*(4), 319-324. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.926002>
- Martínez Ramírez, J. L., Piña Parra, J. A., & Wilches Galindo, L. S. (2021). Identificación de *Cryptosporidium* spp en heces de paloma *Columba livia* en puntos críticos de concentración poblacional de palomas en la ciudad de Bogotá, Colombia. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/4753>
- Matta, N. E., Gaitán-Albarracín, F. A., Fuentes-Rodríguez, G. A., Rodríguez-Fandiño, Ó. A., Calixto-Botía, I. F., & Correa-Higuera, L. J. (2025). Survey of West Nile virus infection in wildlife species in the Orinoquia region of Colombia. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1548538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1548538>
- Mattar, S., Edwards, E., Laguado, J., González, M., Alvarez, J., & Komar, N. (2005). West Nile Virus Antibodies in Colombian Horses. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(9), 1497-1498. <https://doi.org/10.3201/eid1109.050426>

National Biological Information Infrastructure (NBII), IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG). Global Invasive Species Database (2025) Species profile: *Columba livia*. Downloaded from <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=1052> on 01-05-2025.

Nebel, C., Harl, J., Pajot, A., Weissenböck, H., Amar, A., & Sumasgutner, P. (2020). High prevalence and genetic diversity of *Haemoproteus columbae* (*Haemosporida: Haemoproteidae*) in feral pigeons *Columba livia* in Cape Town, South Africa. *Parasitology Research*, *119*(2), 447-463. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06558-6>

Osorio, J. E., Ciuoderis, K. A., Lopera, J. G., Piedrahita, L. D., Murphy, D., LeVasseur, J., Carrillo, L., Ocampo, M. C., & Hofmeister, E. (2012). Characterization of West Nile Viruses Isolated from Captive American Flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellin, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *87*(3), 565-572. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0655>

Perez-Garcia, J., Monsalve-Arcila, D., and Marquez-Villegas, C.(2015). Presencia de parásitos y enterobacterias en palomas ferales (*Columba livia*) en áreas urbanas en Envigado, Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* [online]. *33*(3), .370-376. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v33n3a06>.

Papin, J. F., Vahrson, W., & Dittmer, D. P. (2004). SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(4), 1511-1518. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1511-1518.2004>

Parsani, H., Momin, R., Lateef, A., & Shah, N. (2014). Gastro-intestinal helminths of pigeons (

*Columba livia* ) in Gujarat, India. *Egyptian Journal of Biology*, 16, 63.  
<https://doi.org/10.4314/ejb.v16i1.9>

Ramos, B. A., Chiang, J. O., Martins, L. C., Chagas, L. L. das, Silva, F. de A. E., Ferreira, M. S., Freitas, M. N. O., Alcantara, B. N. de, Silva, S. P. da, Miranda, S. A., Sepulveda, B. A., Corrêa, L. T. G., Negrão, A. M. G., Vasconcelos, P. F. da C., & Casseb, A. do R. (2017). Clinical and serological tests for arboviruses in free-living domestic pigeons (*Columba livia*). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(8), 532-536. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170014>

Rosselli, L. (2003). *Aves de Colombia y el virus del Nilo occidental*. Memorias, simposio internacional sobre el Virus del Nilo Occidental y otras encefalitis equinas. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.

Matta, N. E. y Rodríguez, O. A. (2001). Hemoparásitos aviares Avian Haematoza. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 27–34. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63464>

Saborido Calderón, M. L. (2009). Daños que provocan las palomas. *Revista de Clases historia*, 6 (Septiembre), 5 Artículo N°39.

Scherf, B. & Food and Agriculture Organization of the United Nations (Eds.). (2000). *World watch list for domestic animal diversity* (3rd ed). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., & Paul, J. H. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine*, s1-20(4), 471-492. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471>

Spedicato, M., Carmine, I., Bellacicco, A. L., Marruchella, G., Marini, V., Piscicella, M., Di Francesco, G., Lorusso, A., Monaco, F., & Savini, G. (2016). Experimental infection of rock pigeons (*Columba livia*) with three West Nile virus lineage 1 strains isolated in Italy between 2009 and 2012. *Epidemiology and Infection*, *144*(6), 1301-1311. <https://doi.org/10.1017/S0950268815002642>

Tomori, O., & Oluwayelu, D. O. (2023). Domestic animals as potential reservoirs of zoonotic viral diseases. *Annual review of animal biosciences*, *11*(1), 33-55. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-062922-060125>

Uribe, M., & Florez, S. (2021). Presencia de endoparásitos y ectoparásitos con potencial zoonótico en palomas (*Columba livia*) de la plaza de Bolívar de la ciudad de Bogotá Colombia. Trabajo de grado Universidad Antonio Nariño. Repositorio institucional UAN. <http://repositorio.uan.edu.co:8080/bitstream/123456789/2383/1/2020EmmanuelUribe>

Valkiūnas, G., Iezhova, T.A. Keys to the avian Haemoproteus parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). *Malar J* *21*, 269 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04235-1>

Vargas, K., Vargas, F., Sierra Gaviria, E., Arias Hoyos, A., & Morantes, C. (2024). Agroquímicos y foto-fenton: Una revisión sistemática de los impactos socioambientales y parámetros óptimos de remoción de contaminantes Agrochemicals and photo-fenton: A systematic review of socio-environmental impacts and optimal contaminant removal parameters. *Revista Novedades Colombianas*, *19*, 9-24. <https://doi.org/10.47374/novcol.2024.v19.2422>

Vasconcelos, R., Teixeira, R., Silva, I., Lopes, E., & Maciel, W. (2018). Feral pigeons (*Columba livia*) as potential reservoirs of *Salmonella* sp. And *Escherichia coli*. *Arquivos do Instituto Biológico*, *85*. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000412017>

- Vázquez, A., Herrero, L., Negredo, A., Hernández, L., Sánchez-Seco, M. P., & Tenorio, A. (2016). Real time PCR assay for detection of all known lineages of West Nile virus. *Journal of Virological Methods*, 236, 266-270. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.026>
- Velasquez, M., Flórez, A., & Jaramillo Hernández, D. (2023). Influenza aviar de alta patogenicidad y sus saltos interfaces entre aves y mamíferos: Situación actual. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 14, 65-84. <https://doi.org/10.22579/22484817.988>
- Vilibic-Cavlek, T., Bogdanic, M., Savic, V., Hruskar, Z., Barbic, L., Stevanovic, V., Antolasic, L., Milasincic, L., Sabadi, D., Miletic, G., Coric, I., Mrzljak, A., Listes, E., & Savini, G. (2024). Diagnosis of West Nile virus infections: Evaluation of different laboratory methods. *World Journal of Virology*, 13(4), 95986. <https://doi.org/10.5501/wjv.v13.i4.95986>
- Villalba-Sánchez, C., Ossa-Lacayo, A., & Velasquez, J. (2014). *Columba livia domestica* Gmelin, 1789: Plaga o símbolo. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 6, 363. <https://doi.org/10.24188/recia.v6.n2.2014.442>
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 152-179. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>
- Zyrianova, I. M., & Zaripov, O. G. (2022). 18S ribosomal DNA-based PCR test for avian and mammalian DNA identification in meat products. *Veterinary and Animal Science*, 15, 100234. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100234>

## Figuras suplementarias

Figura suplementaria 1. Representación esquemática del Vector de clonación (plásmido) y secuencias empleadas como Control positivo durante la detección de; A. VIA y B. VNO.

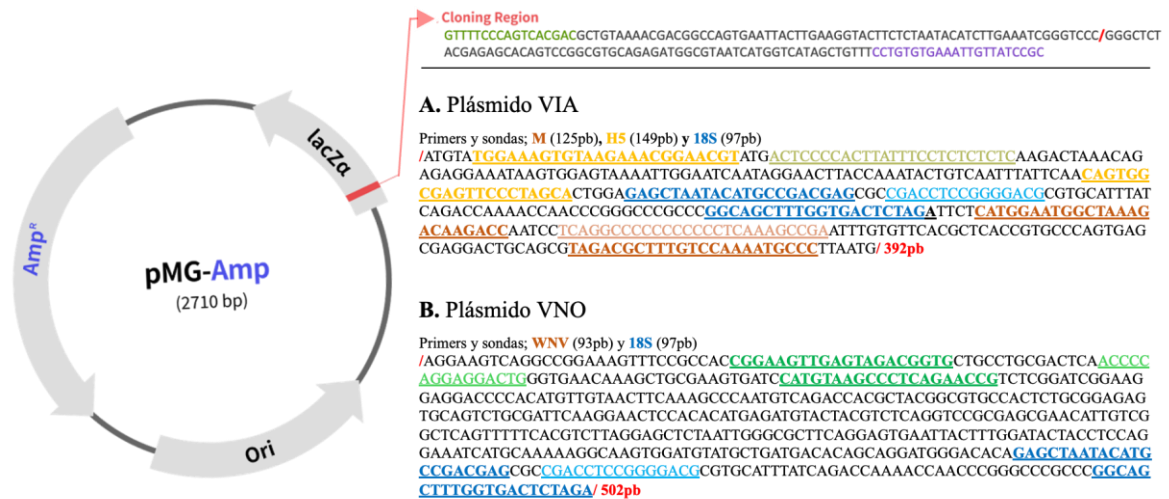


Figura suplementaria 2. Curvas de amplificación (A, C) y fusión (B, D) con los primers de detección para VNO en hisopos orofaríngeos con la metodología SYBR-Green previamente establecidas como positivas por la metodología TaqMan. A-B Control endógeno, gen 18S rRNA y C-D VNO.

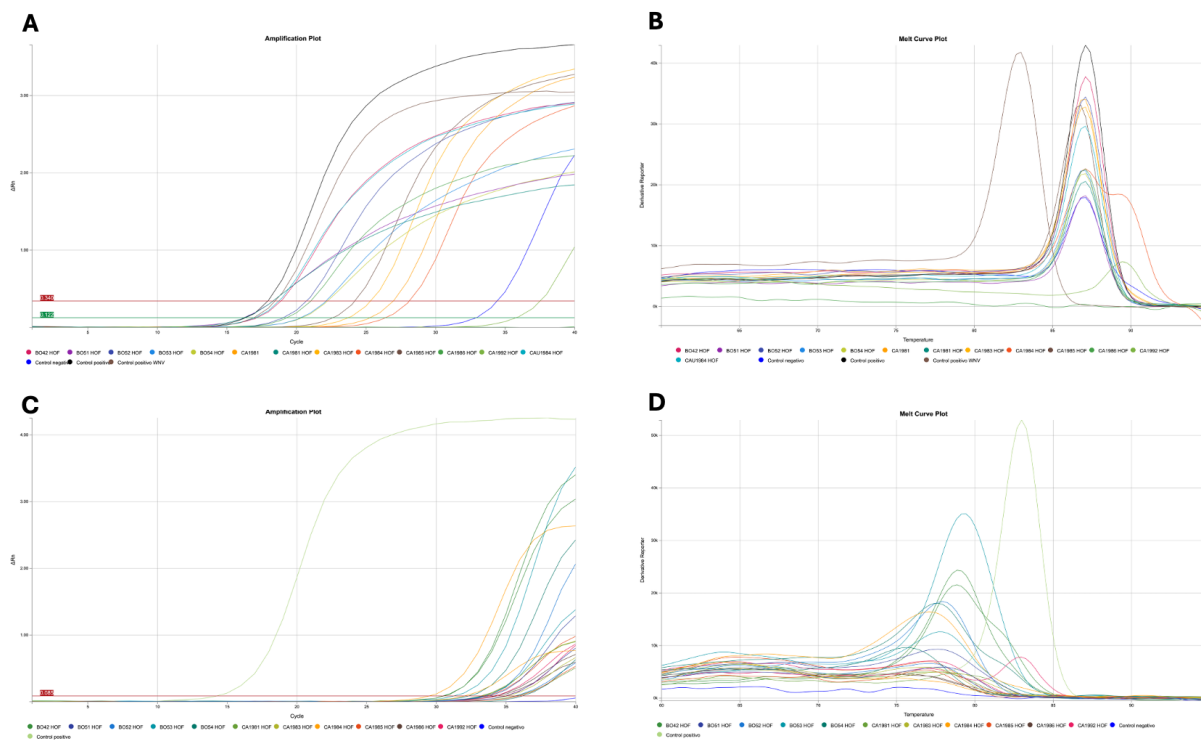


Figura suplementaria 3. Curvas de amplificación (A, C) y fusión (B, D) con los primers alternativos con la metodología SYBR-Green en eluidos previamente establecidas como positivas por la metodología TaqMan. A-B Cápside (WNV\_500\_1), C-D Envoltura (WNV\_500\_3), la única curva apreciable corresponde al producto del control positivo.

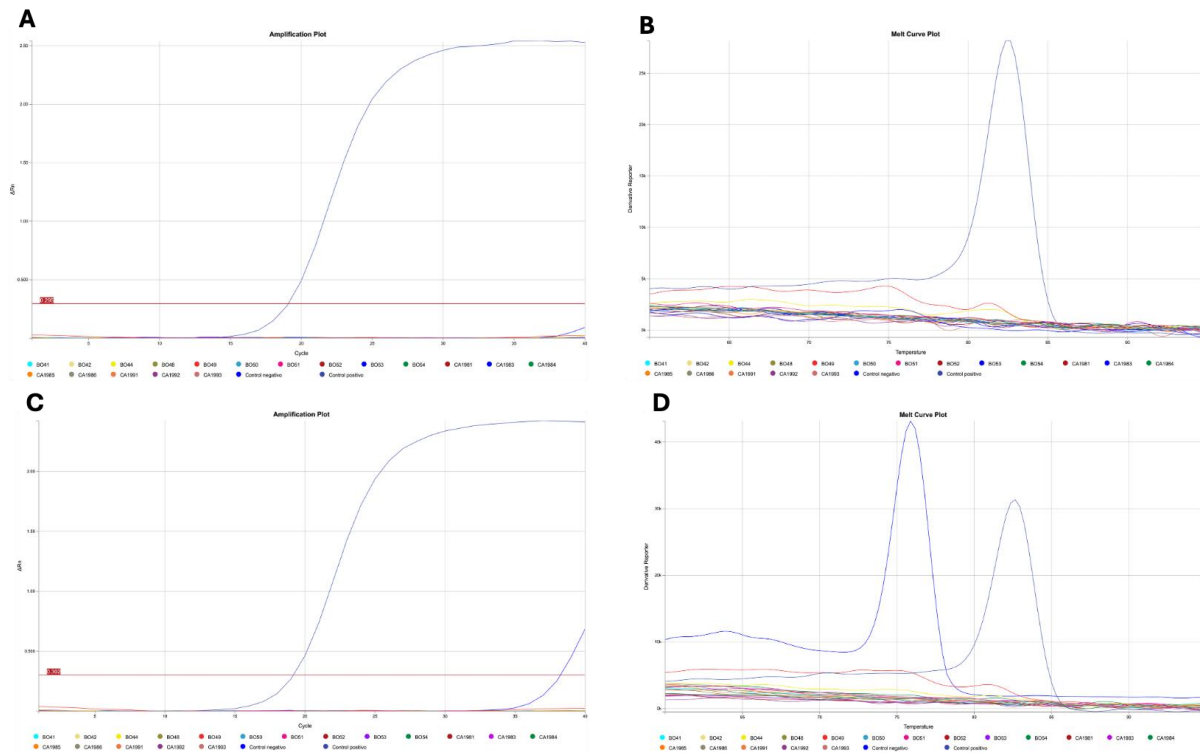


Figura suplementaria 4. Curvas de amplificación (A, C) y fusión (B, D) con los primers alternativos para la región NS5. A-B NS5 proximal 5'-3' (WNV\_500\_19), C-D NS5 media 5'-3' (WNV\_500\_21), y E-F NS5 distal 5'-3' WNV\_500\_27. la única curva apreciable corresponde al producto del control positivo.

