



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación de las especies de *Anopheles* spp. (Diptera:Culicidae), presentes en un foco activo de malaria en Turbo, Antioquia.

Boris René Alejandro Zuleta Ruiz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia

2020

Identificación de las especies de *Anopheles* spp. (Diptera:Culicidae), presentes en un foco activo de malaria en Turbo, Antioquia.

Boris René Alejandro Zuleta Ruiz

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

Magíster en Ciencias - Entomología

Director:

Dr. Freddy Ruiz López

Codirectora:

Dra. Adriana Ortiz Reyes

Línea de Investigación:

Entomología Médica

Grupo de Investigación:

Instituto Colombiano de Medicina Tropical - ICMT, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET

Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2019

A Iris Tachai, por abrir una puerta inexplorada por mí y permitir conocerme un poco más.

Apuesto por los que dudan. La duda no es para crear confusiones sino para detectarlas y deshacerlas. La duda no es un signo de debilidad intelectual. Es lo contrario: se necesita más fortaleza para atender una duda, que para aceptar la primera excusa que la quita de en medio. Por todo ello vale la pena dudar... ¿no?

Jorge Wagensberg

Agradecimientos

- A Catalina Ospina, mi compañera de viaje, por comprender mis ausencias.
- Al Dr. Freddy Ruiz López, por la dirección de este trabajo y por sus constantes enseñanzas.
- A la Dra. Adriana Ortiz Reyes, por la paciencia en el desarrollo de esta investigación.
- A la universidad del CES-ICMT y al PECET, por facilitar el desarrollo de las pruebas moleculares en sus laboratorios.
- A Enderson Ramos por sus ayudas y enseñanzas en las técnicas moleculares.
- A Wilber Gómez y Giovanni Zapata por la ayuda en las salidas de campo.
- A doña Amparo, su familia y a la comunidad de la vereda El Olleto, por su hospitalidad y ayuda.
- A Ulises, su familia y la comunidad de la vereda La Islita, por compartir con nosotros sus días y noches.
- Además, a todas las personas que no están consignadas aquí que, de una u otra manera, aportaron para que esta investigación se pudiera desarrollar.

Resumen

La malaria es un grave problema de salud pública en Colombia, con *P. falciparum* y *P. vivax* como los patógenos responsables del 97% de los casos en el país. En el año 2018 se registraron 61.339 casos, siendo los departamentos de Chocó, Nariño, Córdoba y Antioquia los que presentan una mayor incidencia. El departamento de Antioquia presentó 5.415 casos, con la zona de Urabá como una de la más endémica para malaria y donde el municipio de Turbo, fue el segundo en el área con más casos. Las veredas El Olleto y La Islita sitios de esta investigación, históricamente han sido dos veredas que han aportado importante número de casos.

En estas zonas la dinámica de transmisión de malaria es complicada, debido a la presencia de vectores pertenecientes a complejos de especies, al uso del suelo en agricultura, minería; igualmente a los problemas sociales como el desplazamiento forzado no planificado de humanos y a la movilidad común de personas que buscan trabajo, lo que genera poblaciones humanas flotantes portadoras y susceptibles de ser infectados. Debido a la ausencia de una vacuna para malaria, la prevención y control de esta enfermedad, se enfoca en el diagnóstico adecuado y tratamiento oportuno de las personas contagiadas y al control vectorial.

En este contexto, se realizó un estudio que permitiera determinar las especies de *Anopheles* spp. presentes en las localidades estudiadas, evaluando los sitios de cría y su infección natural con *Plasmodium* spp., además de conocer su papel en la transmisión de malaria. En las veredas El Olleto y La Islita, se realizaron cuatro

muestreos entre 2015 y 2016, se instalaron trampas CDC en el intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio, igualmente se realizó búsqueda activa en corrales de animales (vacas, cerdos y gallinas) y sobre atrayente humano protegido, previo consentimiento informado. Todos los especímenes colectados fueron identificados por morfología y por medio de secuencias del gen *Citocromo Oxidasa I - COI* (ADNmt). Además, se evaluó en todos los mosquitos colectados, la infección natural de *Plasmodium* spp., utilizando la prueba de PCR anidada de Snounou de 1993.

Se colectaron 121 mosquitos adultos pertenecientes a cuatro especies, *An. albimanus* s.s. (n = 117), *An. triannulatus* s.l. (n = 1), *An. apicimacula* s.l. (n = 1) y *An. pseudopunctipennis* s.l. (n = 2), el 96% de ellos picando al hombre. Las secuencias obtenidas de *COI* confirmaron las especies identificadas por morfología, no obstante, se observó, sin incluir a *An. albimanus* s.s., que las especies encontradas, hacen parte de complejos de especies, involucradas en la transmisión de malaria en Colombia y/o países vecinos. Ningún mosquito colectado, fue encontrado positivo con *Plasmodium* spp.

Como resultado de las actividades humanas, se encontraron sitios de cría artificiales, que poseen condiciones favorables para la cría de todas las especies colectadas. Aunque los criaderos fueron muy similares, en cuanto composición química, biótica y abiótica, *An. triannulatus* s.l. solo se colectó en un criadero en El Olleto, mientras que *An. apicimacula* s.l. en La Islita. *Anopheles albimanus* s.s. se colectó en los criaderos de ambas localidades, entre tanto que *An. pseudopunctipennis* s.l. no fue colectado en ningún criadero.

Anopheles albimanus s.s. presentó amplia distribución, colectándose en las dos veredas de estudio, tuvo un comportamiento exofágico y exofílico, además de una evidente antropofilia; esta especie posiblemente es el principal vector de malaria en la zona. No obstante, debido a que otras dos de las especies encontradas (*An. pseudopuctipennis* s.l. y *An. triannulatus* s.l.), han sido consideradas vectoras en otras localidades, no se puede descartar, que en altas

densidades poblacionales o en presencia de parásito circundante en la zona, podrían ser un vector de malaria importante en la región.

Aunque no se encontraron mosquitos positivos en las veredas estudiadas, ni pacientes, debido posiblemente a los programas de control vectorial realizados por la Secretaría de Salud Departamental de Antioquia, incluido el programa de “Papa Luis” entre los 2012 al 2014, las zonas estudiadas son de alto riesgo de transmisión de malaria, debido a los vectores encontradas y su grado de antropofilia, y la disponibilidad de sitios de cría cerca de las viviendas.

La existencia de condiciones geográficas, climáticas, económicas y socioculturales particulares de la zona; ligado a los procesos de intervención antrópica, complican la dinámica de transmisión de malaria en las localidades de estudio. En particular las condiciones climáticas presentes en temporada de lluvia, las cuales determinan la dinámica de sitios de cría, que influyen en la presencia o ausencia de especies de *Anopheles* spp., en este estudio se evidencia la necesidad de realizar las intervenciones de mitigación, en la temporadas de lluvia, ya que los insectos van a encontrar mayor oferta de criaderos y por consiguiente aumentaran las densidades poblacionales de insectos adultos, los cuales, solo necesitarán la presencia del parásito en la zona, para el inicio de un nuevo brote de transmisión de malaria.

Palabras clave: *Anopheles*, *citocromo c oxidasa I - COI*, Turbo, vectores, malaria.

Abstract

Identification of *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) present in an active focus of malaria in of Turbo, Antioquia.

In Colombia malaria is a public health concern, with *P. falciparum* and *P. vivax* as the pathogens responsible for 97% of cases in the country. In 2018, 61,339 cases were registered, with the departments of Chocó, Nariño, Córdoba and Antioquia with the highest reported case incidence. The department of Antioquia reported 5,415 cases, with the Urabá region as one of the most endemic for malaria. This is followed by the municipality of Turbo as the area with the second most reported cases, whose villages El Olleto and La Islita - the sites of this research - historically have contributed a significant number of cases.

In these two villages the dynamics of malaria transmission are compounded by the presence of vectors belonging to species complexes and differences in land use such as agriculture or mining. Furthermore, social problems such as forced displacement and common mobility of people seeking work, generates floating, bearer and susceptible malaria human populations. Due to the absence of a vaccine for malaria, the prevention and control of this disease relies mainly on the diagnosis and timely treatment of infected people, as well as, vector control.

In this context, a study was conducted in the villages of El Olleto and La Islita to determine the species of *Anopheles* spp. present, to evaluate the breeding sites and their natural infection with *Plasmodium* spp., and to know their role in the transmission of malaria. Four samplings were carried out between 2015 and 2016. CDC traps were installed in the intra-domiciliary peridomicil and extra-domicile, also active search was carried out in animal (cows, pigs and

chickens) and on protected human attractant, with prior informed consent. All the collected specimens were identified by morphology and by Cytochrome Oxidase I-IOC (*COI*) gene sequences, known as the barcode region. In addition, the natural infection of *Plasmodium* spp. was evaluated in all mosquitoes collected using the nested PCR test of Snounou (1993).

A total of 121 *Anopheles* were collected: *Anopheles albimanus* s.s. (n = 117), *An. triannulatus* s.l. (n = 1), *An. pseudopunctipennis* s.l. (n = 2) and *An. Apicimacula* s.l. (n = 1). As a result of human activities, natural and artificial breeding sites were found, which provided favourable conditions for the breeding of all species collected. Although the breeding sites were very similar, in terms of chemical, biotic and abiotic composition, *An. triannulatus* s.l. was only collected in an El Olleto breeding site, whilst *An. Apicimacula* s.l. only in the village of La Islita. *Anopheles albimanus* s.s. was collected in the breeding sites of both localities, meanwhile *An. Pseudopunctipennis* s.l. was not collected in any breeding site sampled.

Anopheles albimanus s.s. presented wide distribution and the highest population densities, being collected in the two villages of study, having an exophageal and exophilic behaviour. In addition to an evident anthropophilia, this species is possibly the main malaria vector in the study region. However, because other species found - *An. Pseudopunctipennis* s.l. and *An. triannulatus* s.l. - have been considered vectors in other locations, it cannot be ruled out that in high population densities or in the presence of surrounding parasite in the area, they can be an important malaria vector in the region.

This study did not find mosquitos or human positive for *Plasmodium* spp. This was possibly explained by vector control programs implemented by the Departmental of Health of Antioquia, which includes the "Papa Luis Program" between 2012 and 2014. However, the areas studied are of high risk of malaria transmission due to the *Anopheles* spp. found, their anthropophilia and the availability of breeding sites near homes.

The particular geographical, climatic, economic and sociocultural conditions of the area; linked to the processes of anthropic intervention, compound the dynamics of malaria transmission in the study locations. In particular the climatic conditions present in the rainy season determine the dynamics of breeding sites and influence the presence or absence of *Anopheles* spp. This study demonstrates the need to perform mitigation interventions in the rainy seasons, due to the increased risk of insect breeding sites and subsequently an increase the population densities of adult insects, which will only require the presence of the parasite in the area to initiate a new outbreak of malaria transmission.

Keywords: *Anopheles*, *cythochrome c oxidase I - COI*, Turbo, vectors, malaria

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XVII
Lista de tablas	XIX
Objetivos.....	1
1. Marco teórico	3
1.1 Malaria.....	3
1.2 Situación de la malaria en el mundo	3
1.3 Situación de la malaria en Suramérica	4
1.4 Situación de malaria en Colombia	7
1.5 Malaria en el municipio de Turbo, sitio de muestreo de esta investigación.....	10
1.6 Mosquitos vectores de malaria	10
1.7 Mosquitos vectores de malaria en Colombia	12
1.8 Especies de <i>Anopheles</i> spp. en el departamento de Antioquia	12
1.9 Complejo de especies en Colombia.....	13
1.9.1 <i>Anopheles nuneztovari</i>	14
1.9.2 <i>Anopheles albitarsis</i>	15
1.9.3 <i>Anopheles triannulatus</i>	15
1.9.4 <i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	16
1.10 Identificación morfológica y molecular de <i>Anopheles</i> spp.....	17
1.11 Prevención y control de malaria en Colombia.....	18
2. Materiales y métodos	21
2.1 Área de estudio.....	21

2.2	Muestreo de adultos de <i>Anopheles</i> spp.....	23
2.3	Muestreo de larvas de <i>Anopheles</i> spp.....	23
2.4	Caracterización de Criaderos.....	24
2.5	Identificación morfológica.....	24
2.6	Confirmación molecular de los <i>Anopheles</i> spp.	25
2.7	Extracción de ADN.....	25
2.7.1	Extracción para identificación de especies utilizando el abdomen.....	26
2.7.2	Extracción para detección de infectividad utilizando cabeza y tórax.....	26
2.8	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la región código de barras - <i>COI</i>	27
2.9	Secuencias de <i>COI</i>	27
2.10	Detección de infección natural por <i>Plasmodium</i> spp.	28
3.	Resultados	31
3.1	Identificación morfológica de adultos	31
3.2	Secuencias de <i>COI</i>	37
3.3	Comparación de secuencias con el GenBank	40
3.4	Identificación morfológica de inmaduros.....	50
3.5	Identificación de sitios de cría para <i>Anopheles</i> spp.	51
3.5.1	Infectividad.....	54
4.	Discusión.....	55
	Conclusiones.....	63
	Referencias Bibliográficas	65

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1-1: Países con transmisión activa de malaria.	4
Figura 1-2: Porcentaje de casos de malaria en la Región de las Américas.....	5
Figura 1-3: Mapa con el reporte de malaria en las Américas 2018.	6
Figura 1-4: Casos de malaria por especie parasitaria.	7
Figura 1-5: Mapas con los casos de malaria complicada y no complicada en Colombia, 2017.	9
Figura 2-1: Zona de estudio, veredas El Olleto y La Islita, municipio de Turbo, Antioquia	22
Figura 2-2: Representación esquemática de los genes de <i>Plasmodium</i> spp. ssrRNA empleados y el protocolo de PCR anidado utilizado para la detección de los parásitos de la malaria a nivel de género y especies.	29
Figura 3-1: Número de <i>Anopheles</i> spp. adultos colectados, discriminado por año y mes de colecta.	33
Figura 3-2: Especies de <i>Anopheles</i> spp. adultos identificados en cada vereda. .	33
Figura 3-3: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, septiembre/2015.....	35
Figura 3-4: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, noviembre/2015.....	35

Figura 3-5: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, marzo/2016.	36
Figura 3-6: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, junio/2016.....	36
Figura 3-7: Número total de mosquitos adultos colectados en las dos localidades por horario de recolecta.	37
Figura 3-8: Fragmento amplificado de 710 pb de <i>COI</i> de <i>An. albimanus</i> . Los nucleótidos subrayados, corresponden a las secuencias de primers 5'-3' (LCO1490 y HCO2198).....	38
Figura 3-9: Árbol NJ-K2P basado en 1000 réplicas, mostrando los valores Bootstrap, mayores al de 20%.	39
Figura 3-10: El árbol NJ-K2P está basado en secuencias propias y secuencias depositadas en el GenBank. Los valores inferiores al 70% no son mostrados. Las secuencias de GenBank se muestran con números de acceso. Todas las secuencias fueron recortadas a 658 pb	41
Figura 3-11: Especies de <i>Anopheles</i> en estadio larval identificadas por morfología en cada vereda.....	50
Figura 3-12: Mapa discriminando especies de mosquitos y larvas recolectados en cada una de las veredas.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3-13: Estanques de la vereda La Islita, municipio de Turbo.	52
Figura 3-14: Estanque en la vereda El Olleto, municipio de Turbo.	52
Figura 3-15: Mapa de estaciones de muestreo georreferenciadas en las veredas El Olleto y La Islita, Municipio de Turbo.	53
Figura 3-16: PCR anidada de Snounou para la amplificación de género (<i>Plasmodium</i> spp). Carriles 1 al 16 pool de <i>Anopheles albimanus</i> . CP: Control positivo de <i>P. falciparum</i> . CN: <i>Anopheles</i> sp. no infectado.	54

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1-1: Casos de malaria no complicada por entidad territorial	8
Tabla 1-2: Comparación de los Listados de especies de <i>Anopheles</i> spp. presentes en el municipio de Turbo.	13
Tabla 2-1: Listado de cebadores y amplificación de fragmentos esperados según especie de parásito de acuerdo a Snounou (1993).....	28
Tabla 3-1: Especies de <i>Anopheles</i> spp. adultos colectados, discriminada por año y mes de colecta.	32
Tabla 3-2: Porcentaje de las especies de <i>Anopheles</i> spp. colectados e identificados por morfología.	34
Tabla 3-3: Frecuencias de nucleótidos, correspondientes a todos los individuos pertenecientes a <i>Anopheles</i> spp. adultos secuenciados (n=31) de Turbo (Antioquia, Colombia).....	38
Tabla 3-4: Distancias genéticas de <i>COI</i> (intra* y entre especies), pertenecientes a cuatro especies de mosquitos (n=32, 23 haplotipos). Veredas El Olleto y La Islita del municipio de Turbo.	40
Tabla 3-5: Número total de larvas de <i>Anopheles</i> colectadas en cada vereda.	50
Tabla 3-6: Parámetros de las características fisicoquímicas del agua de los estanques evaluados.	54

Objetivos

General

Incriminar e identificar por morfología y biología molecular las especies de *Anopheles* spp., presentes en dos áreas endémicas de transmisión de malaria en Turbo, Antioquia.

Específicos

- Identificar las especies de *Anopheles* spp. presentes en las veredas El Olleto y La Islita del municipio de Turbo, utilizando claves morfológicas.
- Identificar las especies crípticas o los complejos de especies de *Anopheles* spp. utilizando la región código de barras, *Citocromo Oxidasa I (COI)*.
- Determinar mediante técnicas moleculares, la infección natural con *Plasmodium* spp. de los anofelinos colectados.
- Caracterizar los criaderos de *Anopheles* spp. presentes en las veredas El Olleto y La Islita, para el desarrollo de futuras medidas de control vectorial.

1. Marco teórico

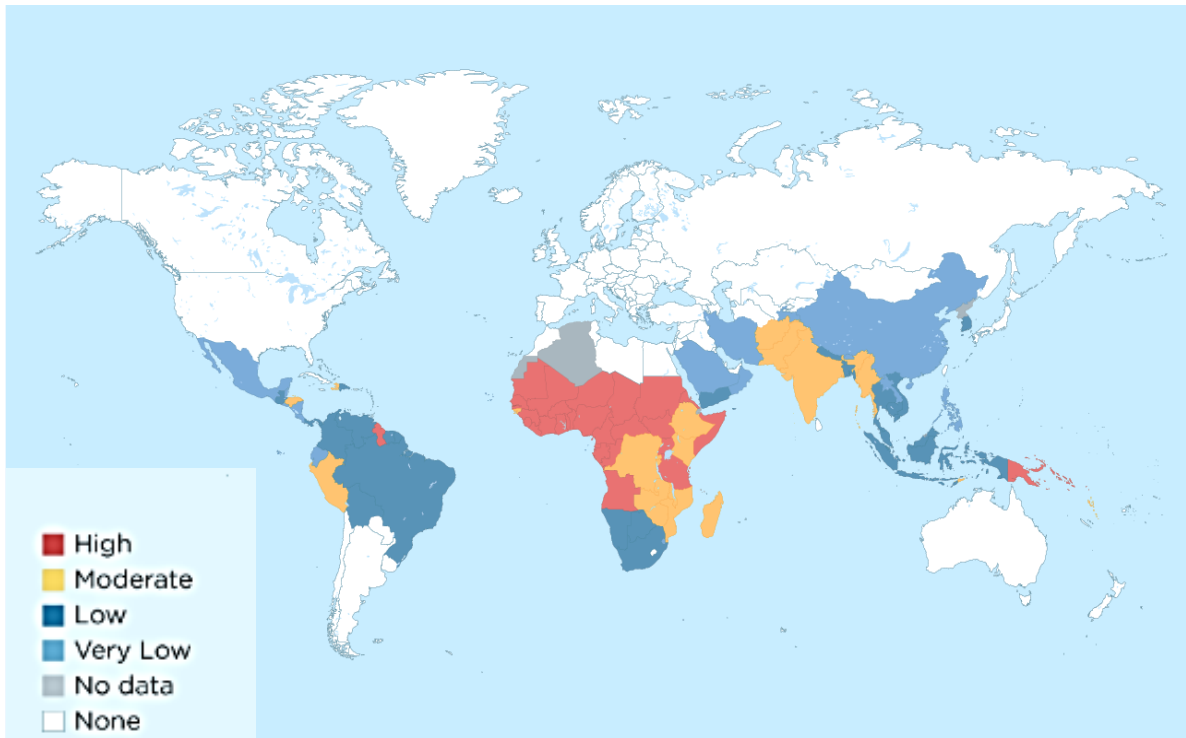
1.1 Malaria

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la malaria o paludismo, es causada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmiten al humano a través de la picadura de mosquitos hembras infectadas del género *Anopheles* (1). Ocho especies de *Plasmodium* spp. son los causantes de la malaria en los humanos, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi*, *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovalae*, *P. simium* y *P. vivax* (2,3), siendo *P. falciparum* y *P. vivax* los más peligrosos, ya que pueden llevar a la muerte a quien lo padezca (1). Cinco de estas especies, están también implicadas en la infección de malaria a distintas especies de monos, *P. cynomolgi* y *P. knowlesi* en el sureste de Asia y *P. brasilianum*, *P. malariae* y *P. simium* en Suramérica (2,4,5).

1.2 Situación de la malaria en el mundo

La malaria continúa siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en países tropicales y subtropicales del mundo (Figura 1-1), particularmente en África (1); según el Centro para la Prevención y Control de las Enfermedades por sus siglas en inglés – CDC (2017) (6), se estima que alrededor de 3,3 billones de personas en el mundo se encuentra en riesgo de contraerla, la WHO (2018) estimó, que los parásitos causantes de malaria, infectaron aproximadamente 219 millones de personas, de los cuales aproximadamente 435.000 mueren principalmente en África, siendo los niños menores de 5 años los más afectados (1).

Figura 1-1: Países con transmisión activa de malaria.



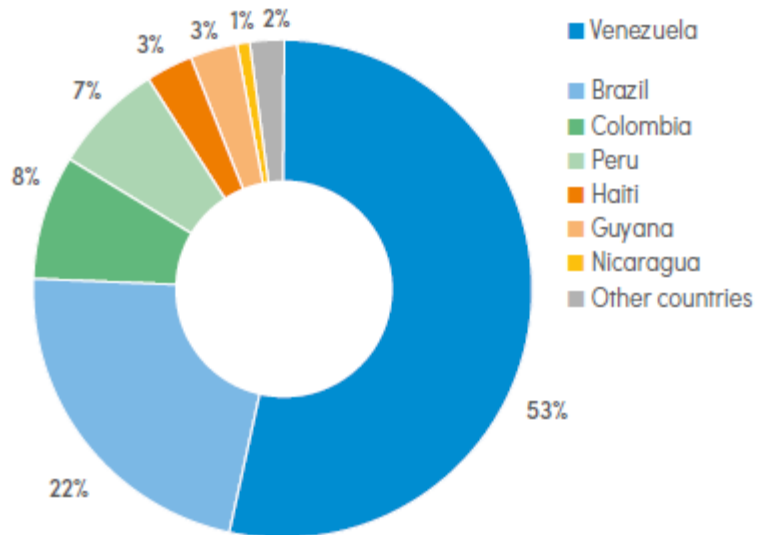
Fuente: CDC, Julio de 2018.

1.3 Situación de la malaria en Suramérica

En América del Sur los países más afectados con malaria son: Venezuela, Brasil, Colombia, Perú y Guayana (1) (Figura 1-2, 1-3). Según la OMS, los casos de malaria están en ascenso en países endémicos, y la respuesta mundial al paludismo se ha estancado (1). En el 2017 los casos incrementaron notablemente con relación a los últimos años, con aproximadamente 219 millones de casos y más de 400 mil muertes (1). Aunque en las Américas se registró un incremento en los casos de malaria, principalmente en Brasil, Nicaragua y Venezuela. Países

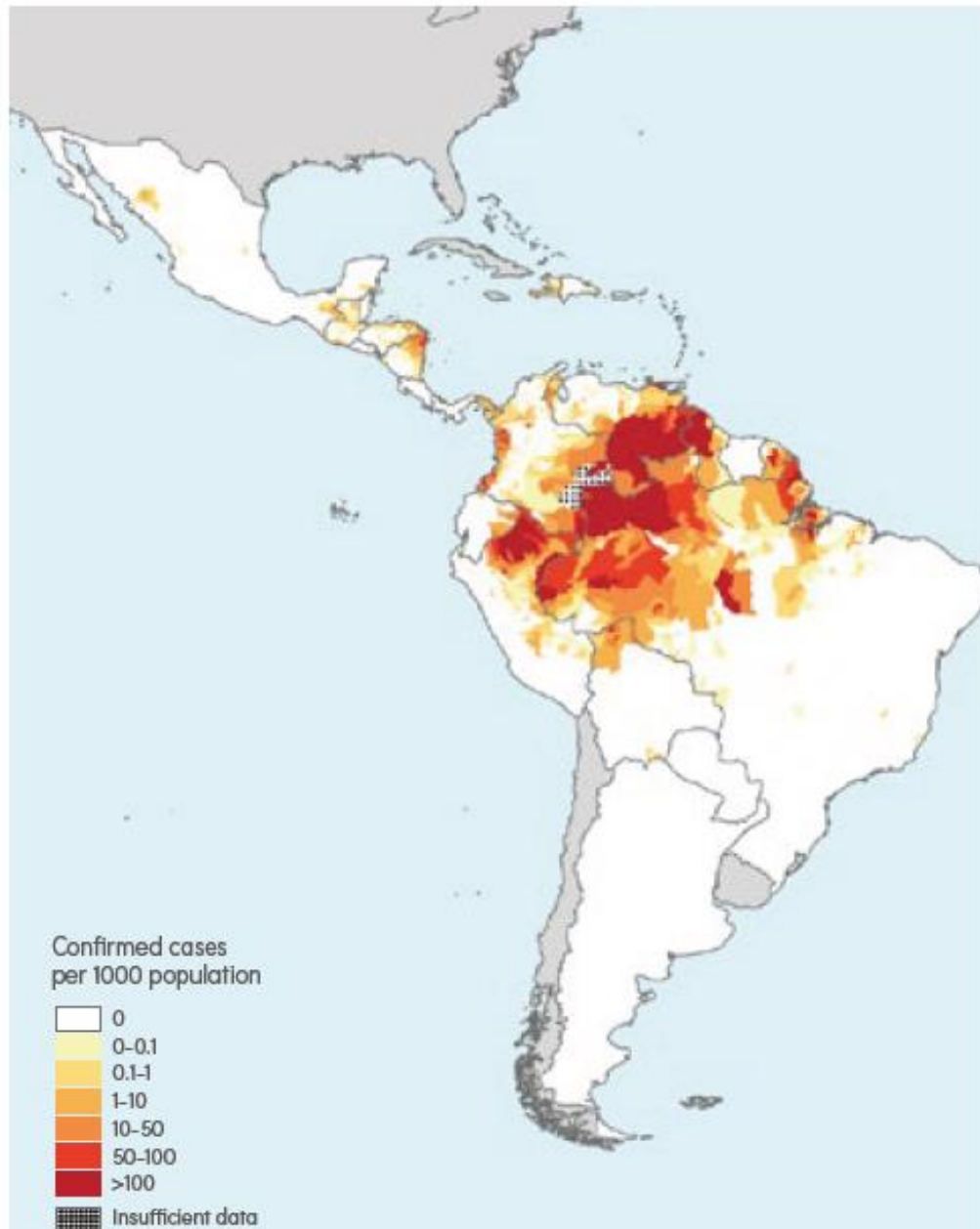
como Colombia, El Salvador, Guatemala, entre otros, presentaron una disminución del 20% (1).

Figura 1-2: Porcentaje de casos de malaria en la Región de las Américas



Fuente: WHO, 2018.

Figura 1-3: Mapa con el reporte de malaria en las Américas 2018.

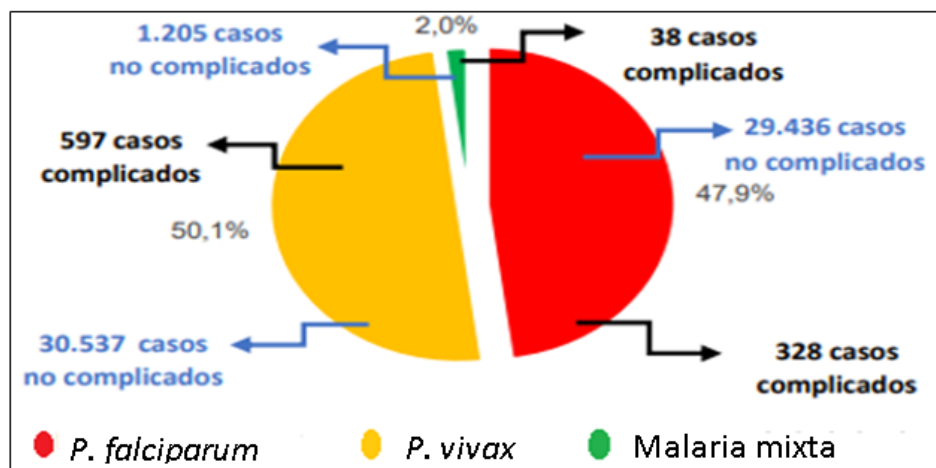


Fuente: WHO, 2018.

1.4 Situación de malaria en Colombia

En Colombia en el año 2018 se registraron 62.141 casos, Antioquia ocupó el cuarto lugar después de los departamentos de Chocó, Nariño y Córdoba, con 5.415 casos, registrándose un aumento con respecto al año 2017 donde se registraron 4.748 casos (7). En el reporte de malaria del 2018 la OMS (1), se informó que *P. vivax*, fue el parásito de mayor circulación en las Américas con un 74.1% de incidencia. En Colombia, el *Plasmodium* de mayor circulación es *P. vivax* con un 50.1 y *P. falciparum* con 49.7%, (7) (Figura 1-4). No obstante, el Instituto Nacional de Salud (INS), llamó la atención con respecto a *P. malariae*, que en el año 2014 el SIVIGILA reportó ocho casos, igualmente, en la Costa del Pacífico Colombiano habían reportado la presencia de *P. malariae* (8). En el año 2016, se reportó la presencia de *P. malariae* en la Amazonía colombiana, sugiriendo la necesidad de evaluar las técnicas actuales de diagnóstico, para establecer correctamente la identidad de *Plasmodium* spp., que está circulando y afectando la población humana, ya que con las técnicas tradicionales de toma de muestras (gota gruesa), se podría estar identificando incorrectamente la especie del parásito y generándose un tratamiento indebido (9).

Figura 1-4: Casos de malaria por especie parasitaria.



Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, 2018.

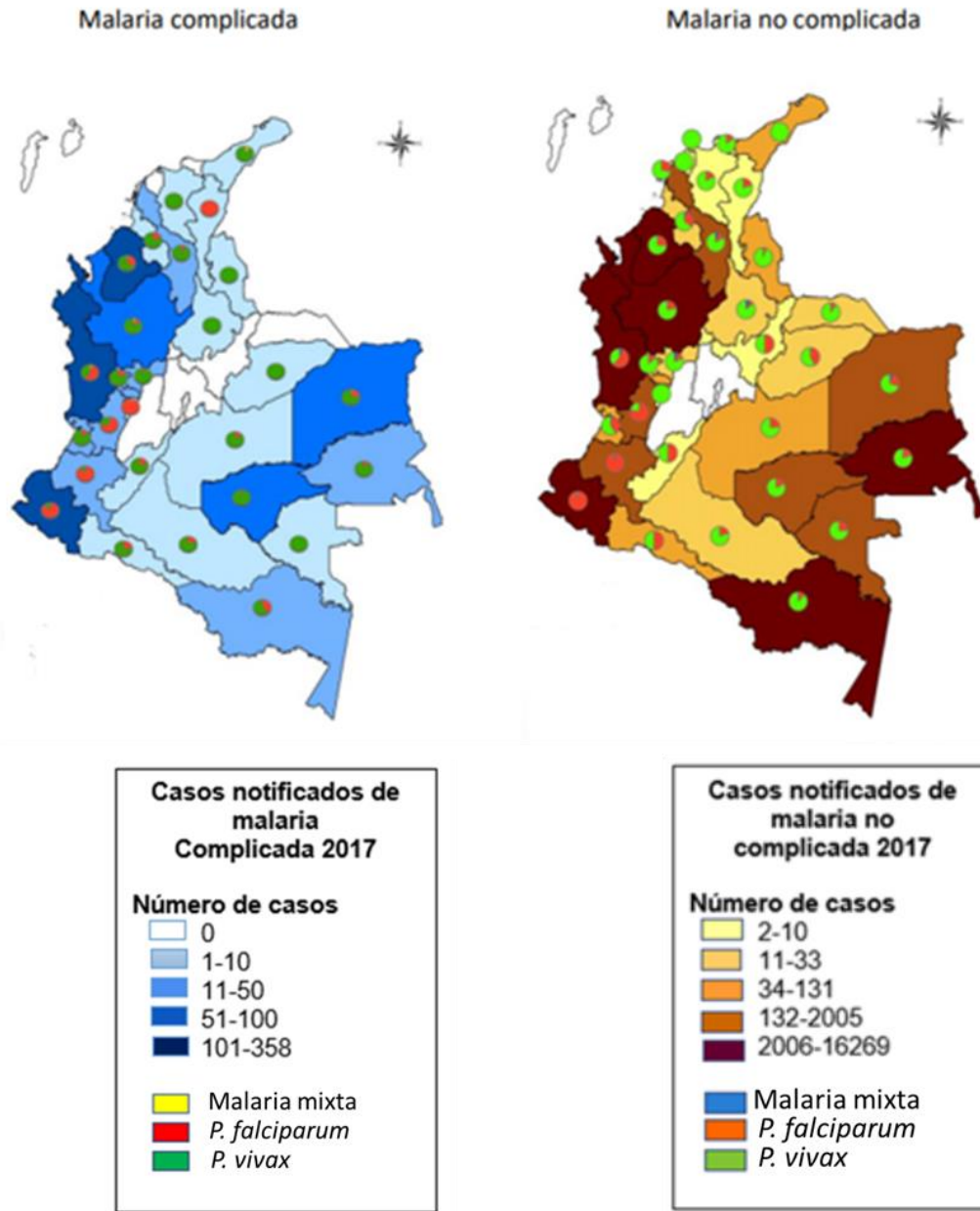
Las zonas de mayor riesgo de malaria son Chocó (27.3%), Nariño (20.9%), Córdoba (15.7%) y Antioquia (9.0%) (7). Igualmente, 18 municipios están en alto riesgo (IPA mayor a 7.64 casos por 1000 habitantes) (Figura 1-5), debido a la migración de la población asociada a actividades mineras, a la industria maderera, al conflicto armado interno y los cultivos ilícitos (10).

Tabla 1-1: Casos de malaria no complicada por entidad territorial

Entidad territorial	Malaria mixta	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	casos	%
Chocó	675	9.471	6.309	0	16.455	27.3
Nariño	22	11.861	744	0	12.627	20.9
Córdoba	57	1.920	7.511	0	9.488	15.7
Antioquia	80	975	4.36	0	5.415	9
Guainia	35	545	2.601	0	3.181	5.3

Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, 2018 (semana epidemiológica 53).

Figura 1-5: Mapas con los casos de malaria complicada y no complicada en Colombia, 2017.



Fuente: Informe Malaria Sivigila, Instituto Nacional de Salud, 2017.

1.5 Malaria en el municipio de Turbo, sitio de muestreo de esta investigación.

Históricamente el municipio de Turbo, ha sido una zona endémica de transmisión de malaria (11), en el 2014 se reportaron 420 casos (11). En el año 2015, se registraron en el municipio 193 casos, una disminución del 46% con respecto al año inmediatamente anterior. Para el año 2016, se presentaron 200 casos y para el 2017, 129 casos fueron registrados. Estos datos, claramente confirman un municipio con alta transmisión de malaria. Las veredas escogidas para este estudio (El Olleto y La Islita), presentan frecuentemente brotes activos de malaria. Durante el año 2013, se registraron 76 casos de malaria en El Olleto y 31 en La Islita, en el 2014 se registraron en la vereda El Olleto 10 casos y la vereda La Islita 3 casos. No obstante, en los últimos años, no se han registrado casos en estas veredas, posiblemente debido a las campañas de prevención y control desarrolladas por las instituciones de salud municipal y departamental (12). Además de esto, hay que abonar los posibles subregistros que puede haber y contemplar el comportamiento de la alta movilidad de las personas en la región. Sin embargo, en las veredas cercanas a estas, si se ha registrado 24 casos desde el 2015 como es el caso de las veredas Tulapa y Tulapita, haciendo pensar que en el área se mantiene una transmisión activa de malaria.

1.6 Mosquitos vectores de malaria

Los mosquitos del género *Anopheles* conocidos frecuentemente como “anofelinos” (12), son insectos que tienen amplia distribución mundial, caracterizándose por su alto grado de plasticidad ecológica y variabilidad morfológica (13). Este género pertenece a la familia Culicidae, que incluye aproximadamente 3.552 especies, con amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (12,14). La clasificación actual divide a la familia en dos subfamilias (Anophelinae y Culicinae), 11 Tribus y

aproximadamente 44 géneros (12). La subfamilia Anophelinae está dividida en tres géneros (*Anopheles*, *Bironella* y *Chagasia*). La mayoría de las especies anophelinas pertenecen al género *Anopheles* que se subdivide en ocho subgéneros: *Anopheles* (183 especies), *Baimaia* (1), *Cellia* (224), *Khristya* (2), *Kerteszia* (12), *Lophopodomys* (6), *Nyssorhynchus* (35) y *Stethomyia* (5) (12,15). Aproximadamente 70 especies de *Anopheles*, son consideradas vectoras de malaria en el mundo (16). En Colombia hay presencia de cinco subgéneros y entre ellos aproximadamente de 40 a 47 especies de *Anopheles*. (13).

Los *Anopheles* son insectos de metamorfosis completa (holometábolos), cuyos estadios juveniles dependen del agua para completar su ciclo de vital, los huevos son dejados directamente sobre la superficie del agua, adaptándose a una variedad de hábitats acuáticos. Algunas especies requieren agua no contaminada con abundante oxígeno, otras se desarrollan en aguas salobres y algunos viven en cavidades tales como huecos de los árboles, en las axilas de las plantas, agujeros de cangrejos, entre otros (12).

Las larvas tienen cuatro estadios antes de formar la pupa, de la cual emerge el individuo adulto; estos se diferencian de otros mosquitos, por no poseer sifón, en cambio poseen una placa espiracular por donde respiran. En estado adulto, algunas de las especies poseen manchas oscuras y claras en las alas (13), solo las hembras son hematófagas y prefieren alimentarse de animales de sangre caliente, condición para la maduración y postura de los huevos, la mayoría de especies tienen mayor actividad de picadura en horas nocturnas o crepusculares (12), lo cual, de acuerdo a sus preferencias alimentarias son catalogados como zoofílicos o antropofílico, una de las condiciones importantes al momento de incriminarlos como vector.

1.7 Mosquitos vectores de malaria en Colombia

En Colombia hay registradas más de 47 especies de anophelinos, de los cuales, basados en evidencia epidemiológica y aislamiento de los parásitos del género *Plasmodium*, hay tres vectores primarios: *An. (Nys.) nuneztovari*, Gabaldon, 1940; *An. (Nys.) albimanus*, Wiedemann, 1920; *An. (Nys.) darlingi*, Root, 1926 (17–19). Hay otras especies consideradas vectores regionales o secundarios como *An. (An.) pseudopunctipennis*, Theobald, 1901; *An. (Ker.) neivai*, Haward, Dyar y Knab, 1913; *An. (Nys.) rangeli* Gabaldon, Cova-Garcia y López, 1940; *An. (An.) calderoni* Wilkerson 1991; *An. (An.) neomaculipalpus* Curri, 1931; *An. (Nys.) oswaldoi* Peryassu 1922; *An. (An.) punctimacula* Dyar y Knab 1906; *An. (Ker.) pholidotus* Zavortink, 1973, *An. (Nys.) benarrochi* (17,20–24).

1.8 Especies de *Anopheles* spp. en el departamento de Antioquia

En el departamento de Antioquia, existen 23 especies de *Anopheles*, de acuerdo a la información suministrada por DSSA la mayoría de ellas registradas en Urabá y Bajo Cauca. En el municipio de Turbo hay 13 especies: *Anopheles albimanus*, *An. darlingi*, *An. (Nys.) aquasalis* Curry 1932, *An. (Nys.) argyritarsis* Robineau-Desvoidy, 1827, *An. (An.) costai* da Fonseca y da Silva Ramos 1940; *An. neomaculipalpus*; *An. nuneztovari*; *An. pseudopunctipennis*, *An. (An.) punctimacula*, *An. rangeli*; *An. triannulatus*, *An. (Nys.) marajoara* Galvao y Damasceno, 1942 (= *An. (Nys.) albitarsis* s.l. (25) y *An. (Nys.) trinkae* Faran, 1979 (26). De acuerdo con otros listados, en el departamento de Antioquia hay 19 especies, y en el municipio de Turbo 13: *An. punctimacula*, *An. (An.) apicimacula* Dyar y Knab 1906, *An. neomaculipalpus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus*, *An. oswaldoi*, *An. rangeli*, *An. nuneztovari*, *An. (Nys.) strodei* Root 1926, *An. triannulatus*, *An. (Nys.) marajoara* Galvao y Damasceno 1942, *An. (Nys.) braziliensis* Chagas 1907 y *An. darlingi* (13) (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Comparación de los Listados de especies de *Anopheles* spp. presentes en el municipio de Turbo.

Especies	DSSA, 2001	González y Carrejo, 2009
<i>An. albimanus</i>	√	√
<i>An. apicimacula</i>	X	√
<i>An. aquasalis</i>	√	X
<i>An. argiritarsis</i>	√	X
<i>An. braziliensis</i>	X	√
<i>An. costai</i>	√	X
<i>An. darlingi</i>	√	√
<i>An. neomaculipalpus</i>	√	√
<i>An. nuneztovari</i>	√	√
<i>An. marajoara</i> (= <i>An. albitarsis</i> s.l., Ruiz et al. 2012)	√	√
<i>An. oswaldoi</i>	X	√
<i>An. pseudopunctipennis</i>	√	√
<i>An. punctimacula</i>	√	√
<i>An. rangeli</i>	√	√
<i>An. strodei</i>	X	√
<i>An. triannulatus</i>	√	√
<i>An. trinkae</i>	√	X

Fuente: Elaboración propia basada en los listados del DSSA González y Carrejo y Ruiz et al. (13,25,26).

1.9 Complejo de especies en Colombia

De las especies de *Anopheles* formalmente reconocidos a nivel mundial, 14 especies son miembros de complejos de especies (16). En Colombia un total de seis especies han sido consideradas complejos de especies como: *Anopheles nuneztovari* (27–31), *An. oswaldoi* (32), *An. albitarsis* (25,33), *An. Triannulatus* (34,35) , *An. pseudopunctipennis* (36,37) y *An. benarrochi* (25).

El departamento de Antioquia se han reportado la presencia de los complejos *An. oswaldoi*, *An. nuneztovari*, *An. pseudopunctipennis* y *An. triannulatus* (13).

1.9.1 *Anopheles nuneztovari*

Anopheles nuneztovari fue descrito en San Carlos, Cojedes, Venezuela 1940 (Localidad Tipo, LC). Está ampliamente distribuida desde el oriente de Panamá y el norte de América del Sur hasta la Amazonía, presenta diferencias importantes en el hábito de picadura y comportamiento de las poblaciones de Colombia y Venezuela, por lo que es considerado un complejo de especies (27–30). Elliot en 1972, al comparar las poblaciones de la Amazonía brasilera, llevó a proponer que estas poblaciones alopátricas eran geográficamente distintas (38). Esta teoría fue corroborada posteriormente con experimentos genéticos que demostraron que en las poblaciones de Venezuela y Brasil existían diferencias cromosómicas, lo que seguramente hacía que hubiese diferencias comportamentales entre ellas (39). En estudios posteriores de análisis cromosómicos, se describieron tres citotipos: citotipo A (Amazonía) y citotipo B (Venezuela) y citotipo C (Venezuela /Colombia) (31). Posteriormente otros estudios, ayudaron a la separación de estos citotipos. A través de estudios comparativos de la morfología de los huevos (40), isoenzimas (41) y ADN (42,43). Sierra *et al.* (30), evaluando mosquitos de poblaciones al lado y lado de la cordillera de los Andes colombianos determinó que los citotipos B y C son coespecíficos (30). En este complejo estaban también *An. goeldii*, resucitado por Calado *et al.* (44) y *An. dunhami*, el cual fue revalidado nuevamente como especie por Peyton en 1993 (45).

En el departamento de Antioquia *An. nuneztovari* s.l. es un importante vector y se encuentra en varios municipios de la región del Bajo Cauca y Urabá (11). Este importante vector también está presente en el municipio de Turbo (13).

1.9.2 *Anopheles albitarsis*

Anopheles albitarsis fue descrita en Baradero, Buenos Aires, Argentina en 1878 (Localidad Tipo, LC). Actualmente se considera un complejo de especies basado en secuencias de *COI* y *ITS2* (25): *Anopheles Albitarsis* s.s. Lynch Arribálzaga, 1878, *An. deaneorum* Rosa-Freitas, 1989, *An. janconnae* Wilkerson y Sallum, 2009, *An. marajoara*, *An. oryzalimnetes* Wilkerson y Motoki, 2009, *An. albitarsis* F, *An. albitarsis* G y *An. albitarsis* I. Además, los autores proponen un nuevo linaje mitocondrial, *An. albitarsis* H, que requiere un mayor estudio y análisis adicional, para poder resolver su verdadero estatus taxonómico (25). Este complejo es de importancia epidemiológica, algunos de sus miembros han estado incriminados en la transmisión de malaria en Brasil como, *An. (Nys.) deaneorum* (46); *An. (Nys.) janconnae* Wilkerson y Sallum (47) y *An. marajoara* (48). En Colombia se encuentra, *An. albitarsis* F y *An. albitarsis* I, las cuales no han sido incriminados como vectores de malaria. Esta especie no se encuentra registrada en el municipio de Turbo.

1.9.3 *Anopheles triannulatus*

Anopheles triannulatus fue descrita en Río Cuiaba Fazenda Sao Joao, Mato Grosso, Brasil, 1922 (Localidad Tipo, LC), se distribuye desde Nicaragua hasta Argentina (49). Los primeros estudios del complejo Triannulatus fueron realizados en Brasil, en los cuales se decía que *An. triannulatus* era una especie polimórfica (49–51). Al describirse una nueva especie: *An. (Nys.) halophylus* (52), se elevó de especie polimórfica a complejo de especies (35,53). Posteriores análisis de distancias genéticas, detectaron una tercera especie, *An. triannulatus* C (35). Actualmente *An. triannulatus* es un complejo de al menos tres especies, *An. triannulatus* s.s., *An. triannulatus* C y *An. halophylus*. Moreno *et al.* (34) sugiere que *An. halophylus* y *An. triannulatus* C se encuentran en proceso de especiación incipiente. En Colombia no ha sido incriminado como vector de

malaria, sin embargo, ha sido encontrado infectado con *P. vivax* (54) y con *P. vivax* y *P. falciparum* (55). De la misma manera, en otro estudio donde se colectaron mosquitos en localidades de cuatro departamentos se encontró un *An. triannulatus* s.l. naturalmente infectado con *Plasmodium* en el municipio de Tarazá (Antioquia). Este espécimen se colectó en corrales de ganado, detectando los parásitos de *Plasmodium* en el intestino medio, lo que para los autores esta condición en particular no lo hace un buen vector, y por lo tanto se descarta la incriminación (56). Esta especie se encuentra reportada para el municipio de Turbo (13,26).

1.9.4 *Anopheles pseudopunctipennis*

Anopheles pseudopunctipennis, fue descrito en Grenada [Lesser Antillas] 1901 (Localidad Tipo, LC). Los primeros estudios para poder dilucidar el status taxonómico de *An. pseudopunctipennis* fueron el análisis electroforético de enzimas y con enzimas de restricción (RFLP), los cuales sustentaron un complejo de especies (37), estas conclusiones generaron controversia y confusión (36,57). Posteriormente, Manguin *et al.* (57) llevaron a cabo un estudio electroforético de 42 poblaciones de mosquitos de 10 países en Norte, Centro y Suramérica, sin encontrar diferencias electromórficas que separaran las especies. Sin embargo, con base en los análisis de isoenzimas, encontraron dos poblaciones diferentes *An. pseudopunctipennis* A y *An. pseudopunctipennis* B, distanciadas geográficamente de *An. pseudopunctipennis* de la LC (37,58,59). Coetzee sugirió una tercera especie, *An. pseudopunctipennis* C basado en pruebas citogenéticas de las poblaciones de mosquitos de México y Granada (36). En el momento se reconocen que *An. pseudopunctipennis* es un complejo de especies de al menos tres especies, con una población que ocupa un área entre el sur de Estados Unidos y Suramérica. En Colombia esta especie tiene presencia en varios departamentos, se ha encontrado simpatria con otras especies vectoras como

An. nuneztovari (60) y ha sido asociado a brotes de malaria en el Valle del Cauca (61). Se encuentra reportada para el municipio de Turbo por la Dirección Seccional de Salud de Antioquia (DSSA) y González y Carrejo (13,26).

1.10 Identificación morfológica y molecular de *Anopheles* spp.

Lo forma más tradicional de identificación de los mosquitos ha sido a través de su morfología de adultos y quetotaxia de las larvas, genitalia de los machos, usando claves dicotómicas (49,62,63). Los estudios morfológicos siempre han sido determinantes en estudios de ecoepidemiología de la malaria, a pesar de estas metodologías, la determinación taxonómica de los mosquitos ha presentado dificultades al momento de la identificación, bien sea por que en algunas especies hay solapamiento de algunos de sus caracteres (13,49,62) o la plasticidad fenotípica en caracteres taxonómicos usadas en las claves dicotómicas (64). Por ejemplo, en el subgénero *Nyssorhynchus* hay especies que se solapan con otras por la similaridad interespecífica, no permitiendo tener una correcta identificación entre algunas de sus géneros y especies que los conforman, lo que sugiere que se usen otras metodologías de identificación, como la morfometría y técnicas moleculares (13,25,65).

Para la confirmación taxonómica de las especies, se ha utilizado diversas técnicas moleculares entre las que están: 1) Reacción en Cadena de la Polimerasa - Polimorfismo de la longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP). 2) Secuencias: *Espaciador Transcrito Intergénico 2* (ITS2) del ADNr, Código de barras (barcoding), que fue propuesta por Hebert *et al* (66) como una herramienta complementaria a la morfología clásica, para delimitación de especies; los autores encontraron un fragmento de 710 pb del *Citocromo Oxidasa I COI*, (ADNmt), como un excelente marcador molecular para

delimitación de especies. Esta técnica solo necesita pequeñas cantidades de tejido del organismo, para amplificar esta región mitocondrial (66).

1.11 Prevención y control de malaria en Colombia

Las medidas de control y prevención contra la malaria, se han dirigido a frenar la transmisión, interviniendo principalmente sobre los mosquitos vectores. Para el desarrollo de un programa de control vectorial, que sea efectivo contra los *Anopheles* spp. y en consecuencia sobre la incidencia de la enfermedad, se requiere de varios elementos: a) Incriminación de las especies. b) Conocimiento y comprensión de la bionomía de los vectores. c) Vigilancia epidemiológica. d) Talleres de formación ciudadana e) Implementación de medidas efectivas de control.

Países tropicales y subtropicales, entre ellos Colombia, presentan las condiciones ambientales apropiadas para la exitosa proliferación de diversas especies de *Anopheles* (temperatura 30-37°C, humedad relativa por encima de 80%, gran biodiversidad animal y vegetal). En Colombia, aproximadamente el 60% de la población se encuentra en áreas de amenaza de enfermedad y/o morir por esta causa, máxime si tenemos en cuenta que el 85% del territorio rural colombiano está ubicado por debajo de los 1.600 m.s.n.m. con condiciones epidemiológicas y climáticas aptas para el ciclo de transmisión. Por estas razones del departamento de Antioquia y en ella la región de Urabá, reúne estas condiciones que la hacen uno de los departamentos donde más casos de malaria se presentan en el país.

Debido a que es común encontrar a los mosquitos del género *Anopheles* asociados en complejos, constituidos por especies hermanas, las cuales son morfológicamente idénticas, pero pueden presentar diferencias en su papel como vectores, hábitos alimenticios, en preferencias de hospederos, en el nivel de

antropofilia, en la resistencia a insecticidas y en varios aspectos de su bionomía, la identificación taxonómica correcta de las especies vectoras, es el primer problema a resolver y posteriormente su infección natural con *Plasmodium* spp.

Ahora mismo, la OMS (1) hace un llamado para que los países adopten un enfoque estratégico que ayude a disminuir la carga mundial de malaria para la próxima década, esto con la participación de las universidades y grupos de investigación científica y entidades de salud gubernamentales, haciendo uso los recursos económicos y humanos de la mejor manera para poder cumplir con una de las expectativas del más humilde de los objetivos que es tener un mundo libre de malaria.

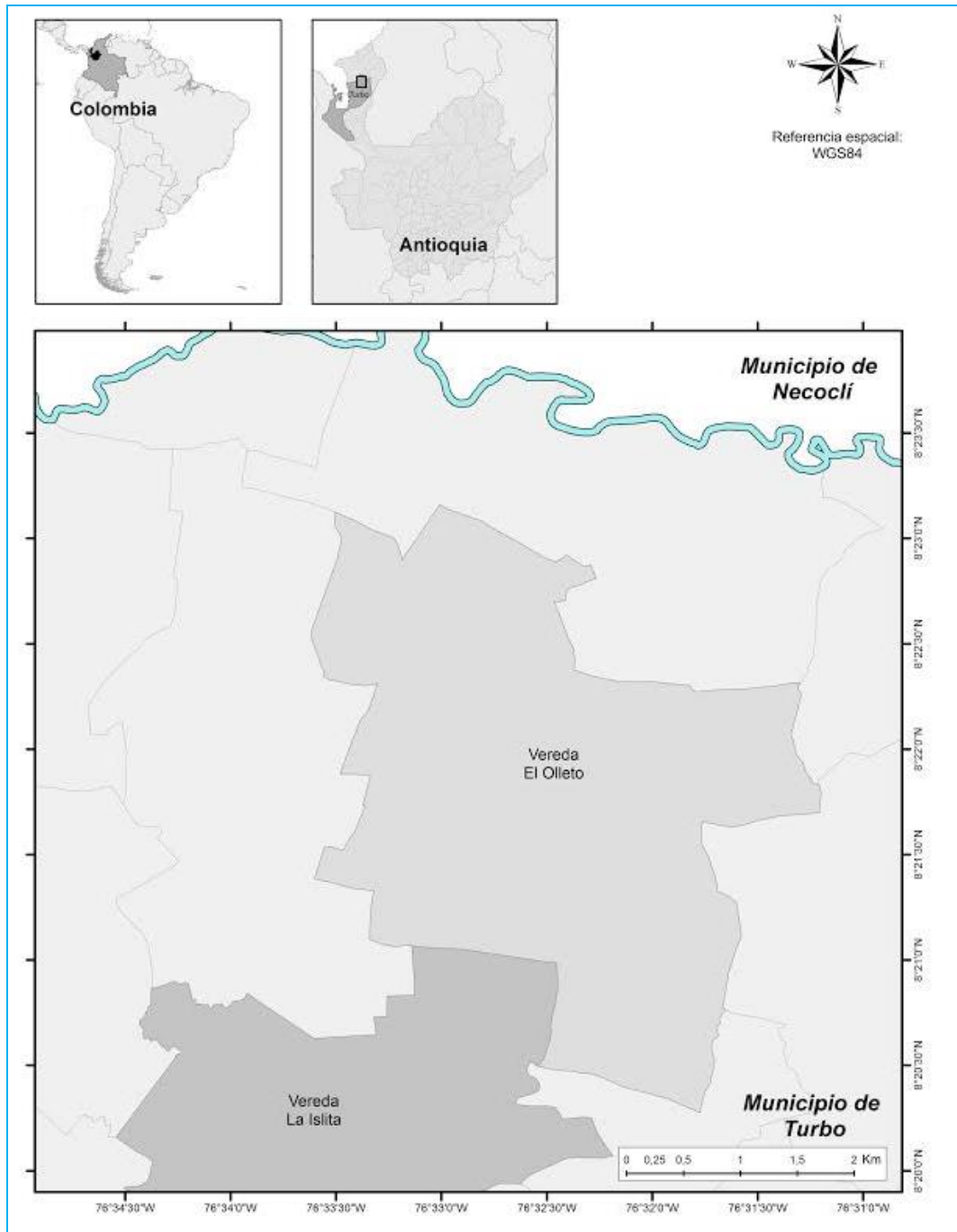
2. Materiales y métodos

2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en la zona rural del municipio de Turbo, este municipio está ubicado al norte del departamento de Antioquia y forma parte de la región de Urabá (Figura 2-1). Tiene un área de 3.055 Km², la altura oscila entre el nivel del mar, hasta los 1.600 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 28°C.

Las veredas seleccionadas fueron El Olleto (8°22'03.5'' N, 76°32'59.4'' W) y La Islita (8°20'37.4'' N, 76°33'05.8'' W) (Figura 2-1). Estas veredas están conformados por poblaciones pequeñas de 130 y 110 habitantes respectivamente, de población mestiza, los habitantes viven en condiciones de pobreza extrema, con necesidades básicas insatisfechas, lo que ha sido resaltado por los turbeños, como el principal problema en todo el municipio (67).

Figura 2-1: Zona de estudio, veredas El Olleto y La Islita, municipio de Turbo, Antioquia



Fuente: Elaboración propia, programa ArcGIS 10.6.

2.2 Muestreo de adultos de *Anopheles* spp.

El muestreo entomológico consistió de cuatro colectas de mosquitos del género *Anopheles* cada tres meses, incluyendo temporadas secas y lluviasas (septiembre y noviembre de 2015; marzo, junio de 2016), tres días por cada vereda, en dos viviendas por día. En cada recolecta, las capturas de mosquitos adultos se realizaron en el intradomicilio y peridomicilio, utilizando trampas de luz tipo CDC, de 18:00 a las 06:00 horas. Además, se utilizaron aspiradores bucales para recolectar los mosquitos, que estaban intentando picar a las personas y a los animales de corral, entre las 18:00 y las 22:00 horas. Todos los especímenes recolectados se almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, perforados en la parte superior (tapa), y fueron almacenados en bolsas de cierre hermético, las cuales tenían en su interior sílica gel.

2.3 Muestreo de larvas de *Anopheles* spp.

Todos los criaderos ubicados alrededor de las viviendas en un radio de 200m, fueron georreferenciados. Se realizaron recolectas de larvas de tercer y cuarto estadio, entre las 07:00 y 10:00 horas, en cada cuerpo de agua (jaguey) se tomaron muestras con cucharones, 10 cucharonados por cada metro cuadrado de superficie, según metodología de la OMS (68), donde los criaderos se clasificaron según el tipo y el tamaño: pequeños (<10m²), medianos (de 10 a 100m²) y grandes (>100m²).

Las larvas colectadas se mantuvieron vivas individualmente, hasta completar su desarrollo, metodología conocida como “series”, de esta forma, se obtenían la exuvia de la larva, la pupa y el adulto del mismo ejemplar, para una correcta identificación taxonómica. Las exuvias se preservaron en viales Eppendorf de 1,5 ml con alcohol al 70 % y los adultos se empacaron en los mismos viales con la tapa perforada, un ejemplar por vial; y se almacenaron en bolsas de cierre

hermético con sílica gel (25). Este material se rotuló, para luego ser transportado al Laboratorio de Entomología Médica del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) “Antonio Roldán Betancur”, Sabaneta (Antioquia), donde se realizaron los montajes y almacenamientos respectivos, siguiendo la metodología propuesta por González y Carrejo (13).

2.4 Caracterización de Criaderos

Con el propósito de comprender la ecología de los estadios inmaduros de los anofelinos de las veredas El Olleto y La Islita, se procedió a identificar y caracterizar los criaderos en sus aspectos abióticos principalmente, que pueden determinar la presencia de las diferentes especies allí encontradas (69). A estos criaderos se les midió las variables: pH (pHmetro WTW 3210), temperatura y oxígeno disuelto (oxímetro WTW 3310) y conductividad (conductímetro WTW 3310).

Los puntos de captura de larvas y adultos fueron registrados con un GPS portátil Garmin® eTrexLegend®. Se utilizó cartografía base, disponible de fuentes oficiales (IGAC, Gobernación de Antioquia), sobre la cual, fueron ubicados tanto las viviendas donde se hicieron las colectas de adultos, como de los criaderos. Se utilizó el software ArcGIS 10, para desarrollar una base de datos espacial, que permitió almacenar y gestionar los geodatos y generar mapas de distribución espacial de las recolectas.

2.5 Identificación morfológica

Los especímenes colectados se identificaron por morfología de estados inmaduros y adultos, utilizando claves morfológicas (13,49,62,70).

2.6 Confirmación molecular de los *Anopheles* spp.

Para la confirmación taxonómica de las especies, se secuenció un fragmento del gen mitocondrial *Citocromo Oxidasa I* (*COI*, DNAm, región código de barras) de los mosquitos, utilizando el protocolo descrito por Scott *et al.* (71). Esta región de 710 pb, ha ayudado a solucionar problemas de especies isomórficas o complejos de especies (25,32). Las secuencias generadas en esta investigación, harán parte de *Mosquito Barcoding Initiative* y se depositaron en la base de datos del GenBank. Una vez editadas las secuencias, se cotejaron con las disponibles en el banco de secuencias GenBank, utilizando BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), disponible en línea en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), con el fin de esclarecer las identificaciones morfológicas, con base en los porcentajes de identidad, obteniendo un tamaño consenso de 240 secuencias con fragmentos de 516pb, después se analizó con haplotipos únicos quedando un total de 154 secuencias de las encontradas en el GenBank. Se incluyó a *An. darlingi* como grupo externo para la construcción de dendograma NJ-K2P.

2.7 Extracción de ADN

Todos los mosquitos colectados posterior a la identificación morfológicas, fueron disectados en dos partes, abdomen y cabeza – tórax, el abdomen para identificación molecular de cada organismo y cabeza - tórax para evaluar infectividad natural.

2.7.1 Extracción para identificación de especies utilizando el abdomen.

Para la extracción de ADN de los mosquitos, se utilizó el kit de extracción de *Thermo scientific: (GeneJet Genomic)*, usando el protocolo de tejido animal, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Además, algunos especímenes fueron procesados directamente, adicionando una pata de dicho espécimen en la mezcla de PCR, como sugiere Scott *et al.* (71). El ADN extraído se almacenó a -0°C en el ICMT, para posteriormente ser utilizado.

2.7.2 Extracción para detección de infectividad utilizando cabeza y tórax.

El protocolo de extracción del ADN de *Plasmodium sp.* se realizó mediante maceración de los especímenes de 30 - 40 segundos. Posteriormente se les adicionó el reactivo Chelex[®] (w/v) al 5% y se dejó hervir a 99°C por 20 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 12.000 rpm x 5 minutos y se separó el sobrenadante en un tubo nuevo. Posteriormente, se realizaron tres pasos de precipitación y subsiguiente centrifugación a 13.000 rpm y 4°C , así: 100 mL etanol absoluto, centrifugando por 15 min, 100 mL etanol frío al 70% por 5 min, y nuevamente, 100 μL etanol absoluto, por 5 min. Finalmente, se dejó secar el botón por un tiempo mínimo de 30 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 μL de tampón TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6). Las muestras se incubaron a 65°C por 10 min, para garantizar la resuspensión del ADN extraído y se almacenaron a 4°C .

2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la región código de barras - *COI*

La amplificación del fragmento de 710 pb *COI*, se realizó usando el par de cebadores LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCAAGATAATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGA CCAAAAAATCA-3'), descritos por Folmer *et al.* (72). Cada PCR contenía 1 µl de Buffer10x NH₄ (Bioline), 0,5 µl de dNTPs (2,5 mM), 0,3 µl de cada uno de los cebadores (10 mM), 0,4 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µl de Taq polimerasa (Bioline) y 1 µl de ADN molde. La mezcla de la PCR se llevó hasta un volumen final de 10 µl mediante la adición de ddH₂O. Los parámetros de la PCR fueron: 95°C durante 5 minutos; 34 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos; posteriormente 72 °C durante 5 minutos y una temperatura final de 10 °C (73) . El producto de PCR se visualizó en gel de agarosa al 1%, el cual contenía 0,5 mg/ml de Bromuro de Etidio (74).

2.9 Secuencias de *COI*

Las muestras se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen (Corea del Sur) en ambas direcciones. Los cromatogramas se editaron en Sequencher 5.2.4 y se alinearon automáticamente en MEGA 6.06. Las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con las secuencias disponibles en GenBank, usando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la base de datos de BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org>). La diversidad de las secuencias encontradas en esta investigación, se calcularon en MEGA 6.06, usando el modelo Kimura 2 Parametros – K2P (75). Se generó un árbol de NeighborJoining – NJ (76), usando un Bootstrap de 1000 réplicas.

2.10 Detección de infección natural por *Plasmodium* spp.

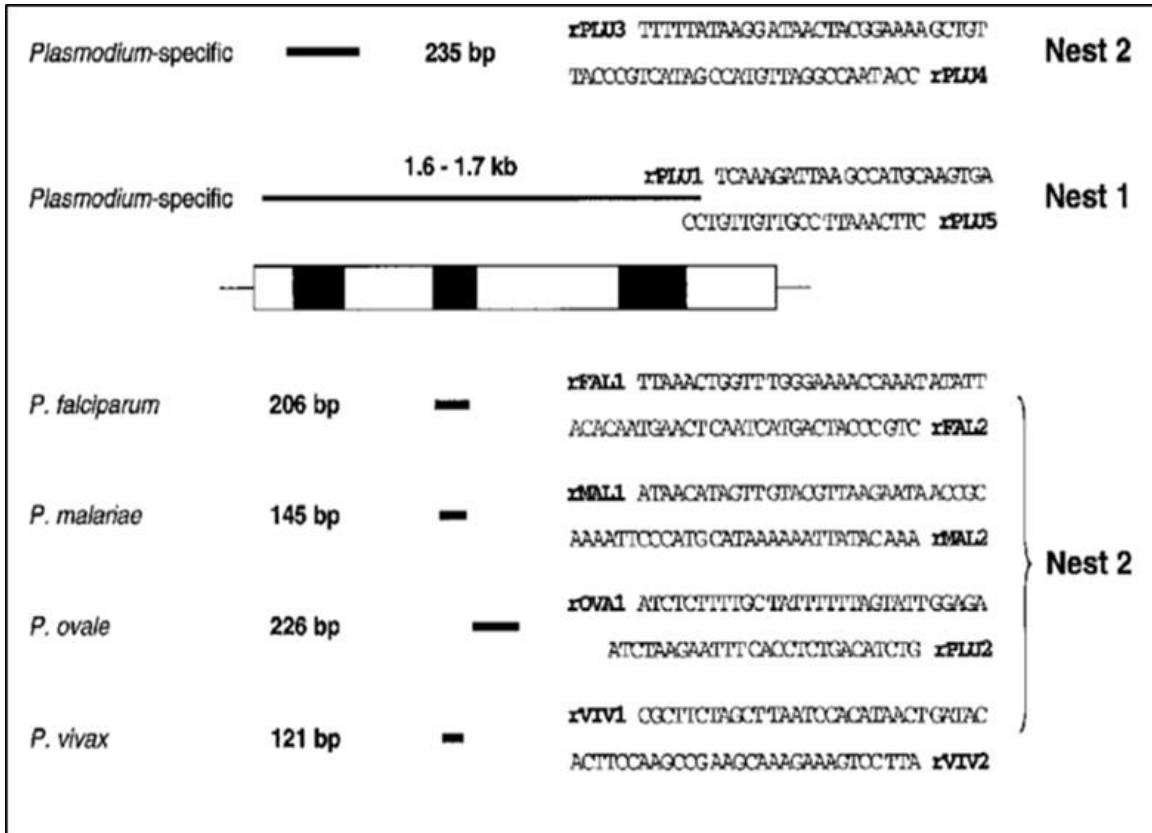
Para la detección del ADN de los parásitos *Plasmodium* sp, se utilizó metodología la PCR anidada descrito por Snounou *et al.* (77) referenciada en la Tabla 2-3 y Figura 2-2. Para esta prueba, se realizaron pools de 7 y 8 muestras de mosquitos por tubo, para un total de 121 mosquitos, con lo que se obtuvieron 16 pools que se sometieron a prueba. Se usó un gel de agarosa al 1.5% para verificar el producto amplificado, el cual fue corrido a 90W voltios, con el buffer TAE 1X y el marcador de peso molecular 100 pb.

Tabla 2-1: Listado de cebadores y amplificación de fragmentos esperados según especie de parásito de acuerdo a Snounou (1993).

Primers	Especie	Pares de Base (pb)
rPLU1 rPLU5	Gen 1	~1670
rPLU3 rPLU4	Gen 2	240
rFAL1 rFAL2	<i>P. falciparum</i>	206
rMAL1 rMAL2	<i>P. malariae</i>	145
rVIV1 rVIV2	<i>P. vivax</i>	121
rOVA1WC rOVA2WC rOVA2v	<i>P. ovale</i> sp.	659-662
PKF1140 PkR1550	<i>P. knowlesi</i>	410

Fuente: Elaboración propia

Figura 2-2: Representación esquemática de los genes de *Plasmodium* spp. *ssrRNA* empleados y el protocolo de PCR anidado utilizado para la detección de los parásitos de la malaria a nivel de género y especies.



Fuente: Snounou *et al.* (84).

3. Resultados

3.1 Identificación morfológica de adultos

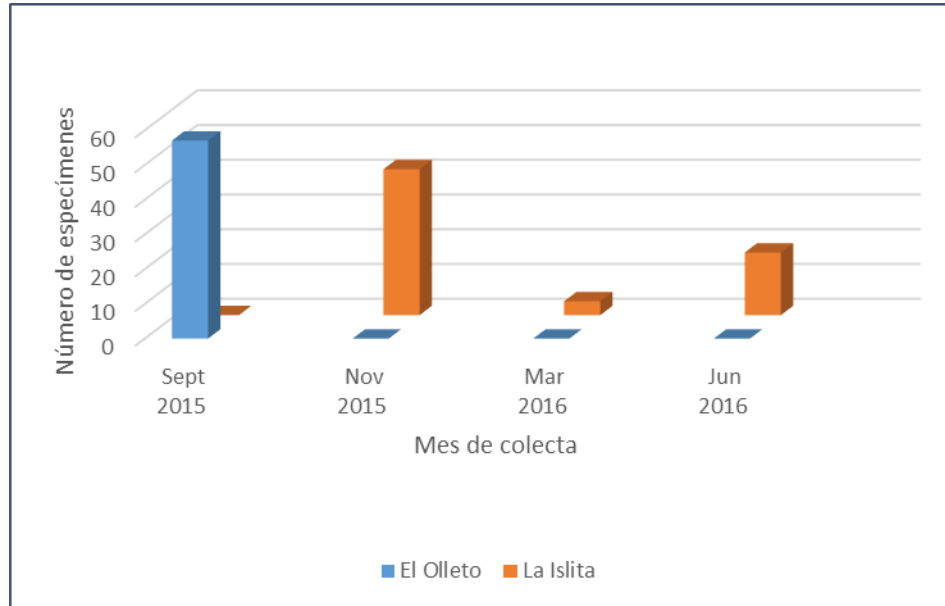
Un total de 121 especímenes fueron colectados solo en el peridomicilio, en cebo humano protegido y en corrales de animales (vacas, cerdos y gallinas), no hubo colectas en las trampas CDC, se identificaron por morfología cuatro especies: *An. albimanus* s.s., *An. triannulatus* s.l., *An. pseudopunctipennis* s.l. y *An. apicimacula* s.l. (Tabla 3-1 y Figura 3-1). La especie más abundante fue *An. albimanus* s.s. (117 individuos, que corresponden al 96.7% del total de mosquitos identificados). Las otras tres especies presentaron muy baja proporción: 1.65% para *An. pseudopunctipennis* s.l. (n = 2) y 0.82% para *An. triannulatus* s.l. (n = 1) y *An. apicimacula* s.l. (n = 1). En la Tablas 3-2 y Figura 3-2, se presenta el total de *Anopheles* colectados por localidad y sitio de captura, en cada una de las veredas muestreadas.

Tabla 3-1: Especies de *Anopheles* spp. adultos colectados, discriminada por año y mes de colecta.

Localidad/Año	Mes	N° total mosquitos colectados	Hora de colección	N° mosquitos colectados	Especie
El Olleto/2015	Sept	57	18:00-19:00	21	<i>An. albimanus</i>
			19:00-20:00	17	<i>An. albimanus</i>
			20:00-21:00	12/1	<i>An. albimanus</i> / <i>An. triannulatus</i>
			21:00-22:00	6	<i>An. albimanus</i>
El Olleto/2016	Nov	0	No colecta	0	(-)
	Mar	0	No colecta	0	(-)
	Jun	0	No colecta	0	(-)
La Isleta/2015	Nov	42	Sept	0	(-)
			18:00-19:00	15/2	<i>An. albimanus</i> / <i>An. pseudopunctipennis</i>
			19:00-20:00	4	<i>An. albimanus</i>
			20:00-21:00	15	<i>An. albimanus</i>
La Isleta/2016	Mar	4	21:00-22:00	6	<i>An. albimanus</i>
			18:00-19:00	4	<i>An. albimanus</i>
			19:00-20:00	0	(-)
	Jun	18	20:00-21:00	0	(-)
			21:00-22:00	0	(-)
			18:00-19:00	10	<i>An. albimanus</i>
			19:00-20:00	7/1	<i>An. albimanus</i> - <i>An. apicimacula</i>
			20:00-21:00	0	(-)
			21:00-22:00	0	(-)

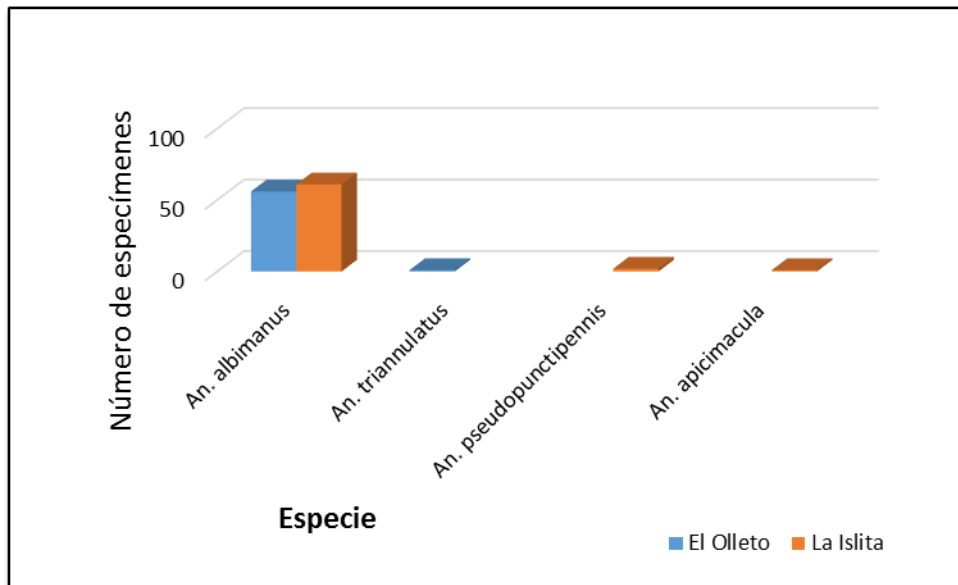
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-1: Número de *Anopheles* spp. adultos colectados, discriminado por año y mes de colecta.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-2: Especies de *Anopheles* spp. adultos identificados en cada vereda.



Fuente: Elaboración propia.

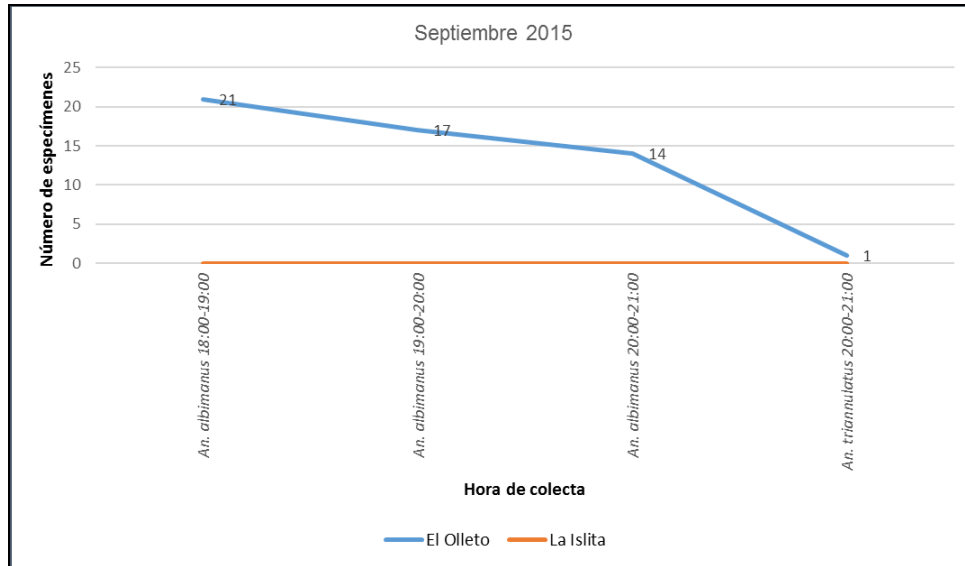
Tabla 3-2: Porcentaje de las especies de *Anopheles spp.* colectados e identificados por morfología.

Especie	Número de mosquitos adultos colectados				Total
	El Olleto		La Islita		
	n	%	n	%	
<i>An. albimanus</i>	56	48	61	52	117
<i>An. triannulatus</i>	1	100	-	-	1
<i>An. pseudopunctipennis</i>	-	-	2	100	2
<i>An. apicimacula</i>	-	-	1	100	1
Total	57	-	64	-	121

Fuente: Elaboración propia.

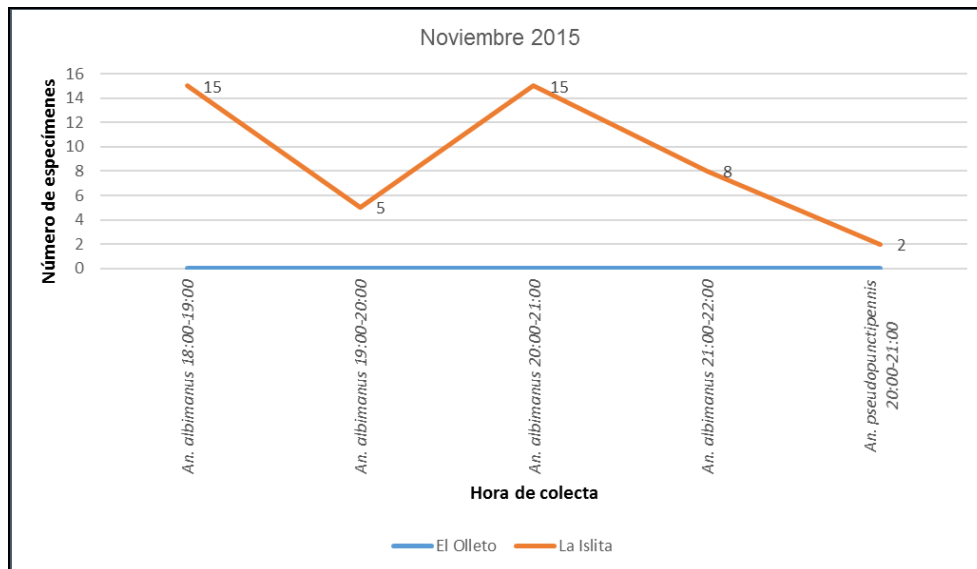
La mayoría de los mosquitos se colectaron entre las 18:00 y 19:00 horas (Figuras 3-3, 3-4, 3-5, 3-6), seguido de los mosquitos colectados durante las 19:00 y 20:00 horas y las 20:00 y 21:00 horas respectivamente; es importante anotar que, por razones de orden público en la zona, no se pudo recolectar después de las 21:00 horas, salvo en una salida, como se puede observar en la Figura 3-7.

Figura 3-3: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, septiembre/2015.



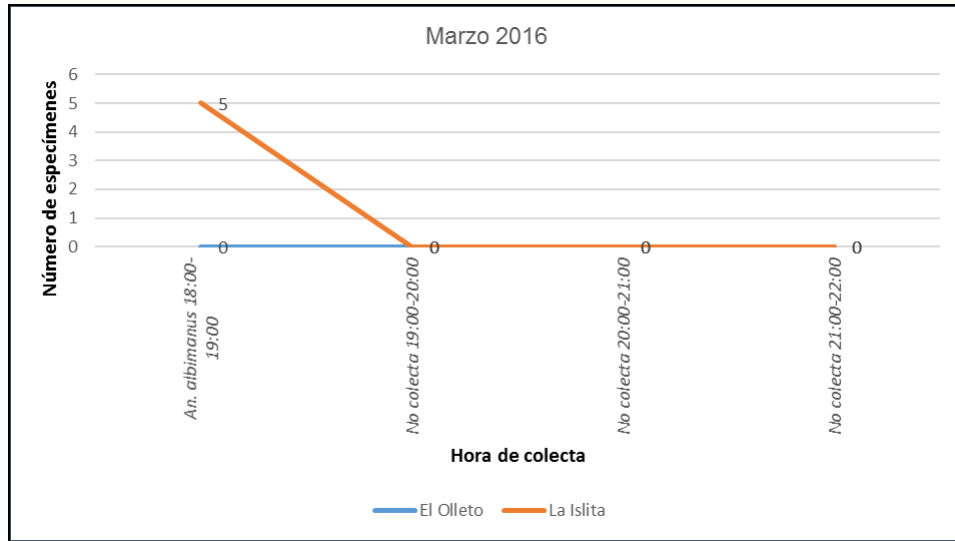
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-4: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, noviembre/2015.



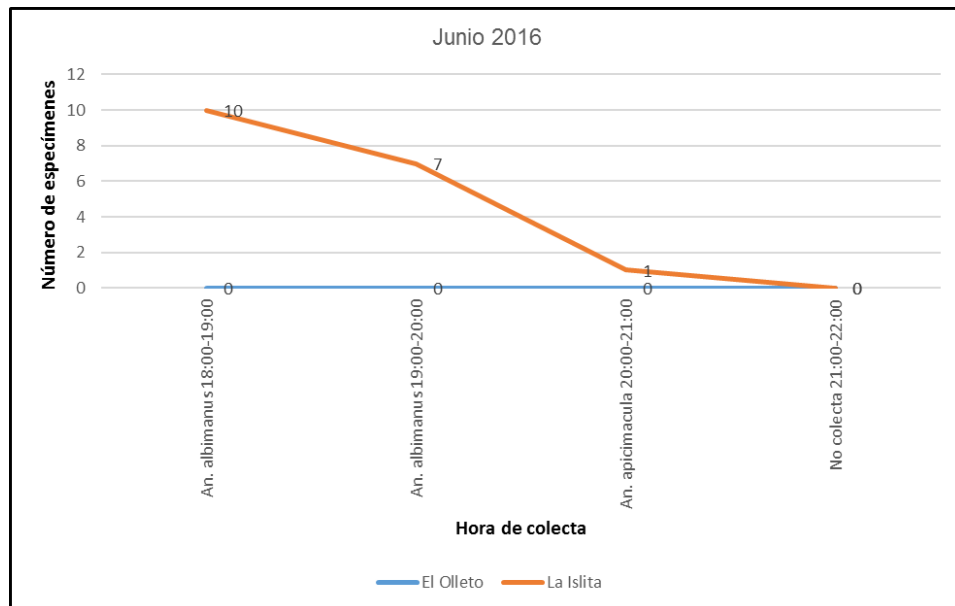
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-5: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, marzo/2016.



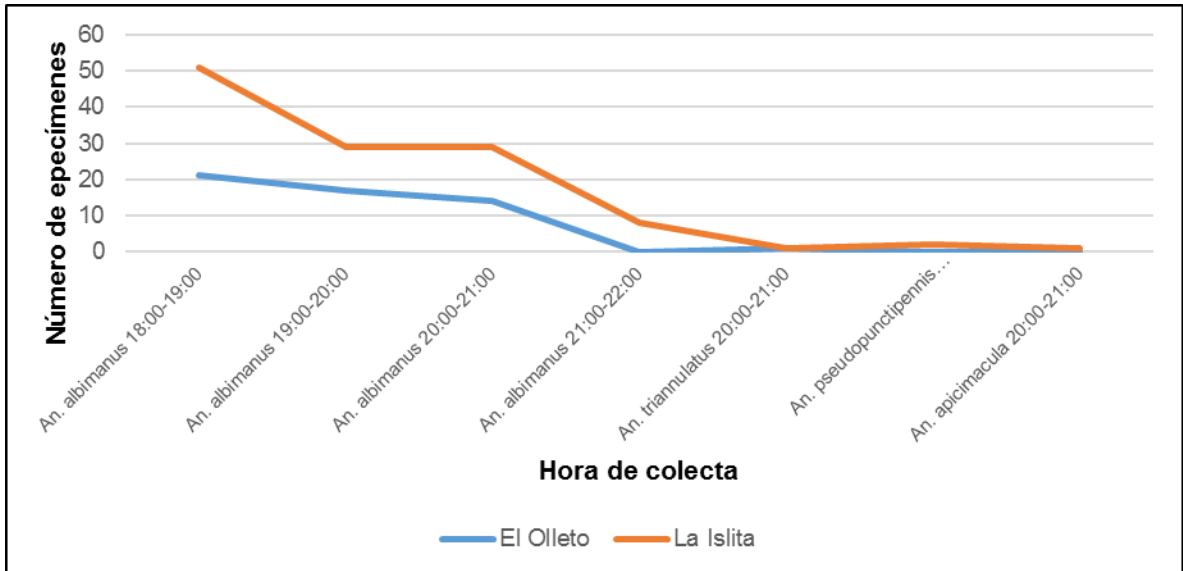
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-6: Número de mosquitos adultos colectados en las dos localidades, junio/2016.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-7: Número total de mosquitos adultos colectados en las dos localidades por horario de recolecta.



Fuente: Elaboración propia.

3.2 Secuencias de COI

Se obtuvieron 31 secuencias pertenecientes a cuatro especies y dos subgéneros: *An. albimanus* s.s. (n = 28), *An. triannulatus* s.l. (n=1), *An. pseudopunctipennis* s.l. (n=2) y *An. apicimacula* s.l. (n=1). El fragmento amplificado fue de 658 pb sin cebadores, se encontraron 23 haplotipos, todas las secuencias fueron depositadas en el GenBank con los siguientes números de acceso:
An. albimanus: KY921762-73, KY921776-83, KY921785-92
An. pseudopunctipennis: KY921775, *An. apicimacula*: KY921774 y
An. triannulatus: KY921784 (Figura 3-8).

Figura 3-8: Fragmento amplificado de 710 pb de *COI* de *An. albimanus*. Los nucleótidos subrayados, corresponden a las secuencias de primers 5'-3' (LCO1490 y HCO2198).

```

GGTCAACAAATCAAGATAATATTGGAACATTATATTTTTATTTTTGGGGCCTGAGCCGGAATA
GTAGGAACCTTCACTAAGAATTCTAATTCGAGCTGAAGTACCCAGGAGCATTATTTG
GAGATGATCAAATTTATAATGTTATTGTAAGTGCACATGCATTTATTATAATTTTTTTATAGT
AATACCAATTATAAATTGGAGGGTTTGGTAATTGATTAGTACCATTAATATTAGGAGCTCCTG
ATATAGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGTTTTTGAATATTACCTCCTTTAACTTTAC
TAATTTCTAGAAGTATAGTAGAAAATGGGGCTGGAACAGGATGAACTGTATACCCTCCTCT
TTCTTCAGGGATTGCTCATGCAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCATTTAG
CTGGGATTTTCATCTATTTTAGGAGCTGTAAATTTTACTACTACAGTAATTAATATACGATCAC
CAGGAATTACATTAGACCGAATGCCTTTATTTGTGTGATCAGTAGTTATTACAGCCGTATTA
TTACTACTATCTTTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTA
AATACATCATTCTTTGATCCTGCAGGAGGAGGAGATCCTATTTTATACCAACATTTATTTAA
ACTTCAGGGTGACCAAAAAATCAG
    
```

Fuente: Elaboración propia.

Los porcentajes promedio de composición de nucleótidos para todas las 31 secuencias fueron de 37.7 (T), 15.6 (C), 30.3 (A) y 16.5 (G) (Tabla 3-3). Las traducciones de aminoácidos no mostraron codones de parada, indicando que todas las secuencias son codificantes de proteínas funcionales, sin pseudogenes (NUMT). El marco de lectura de aminoácidos comienza en la segunda base de las secuencias editadas por cebador (Mega). Los 23 haplotipos, presentan 219 codones, que traducen 214 secuencias de AA (datos no mostrados).

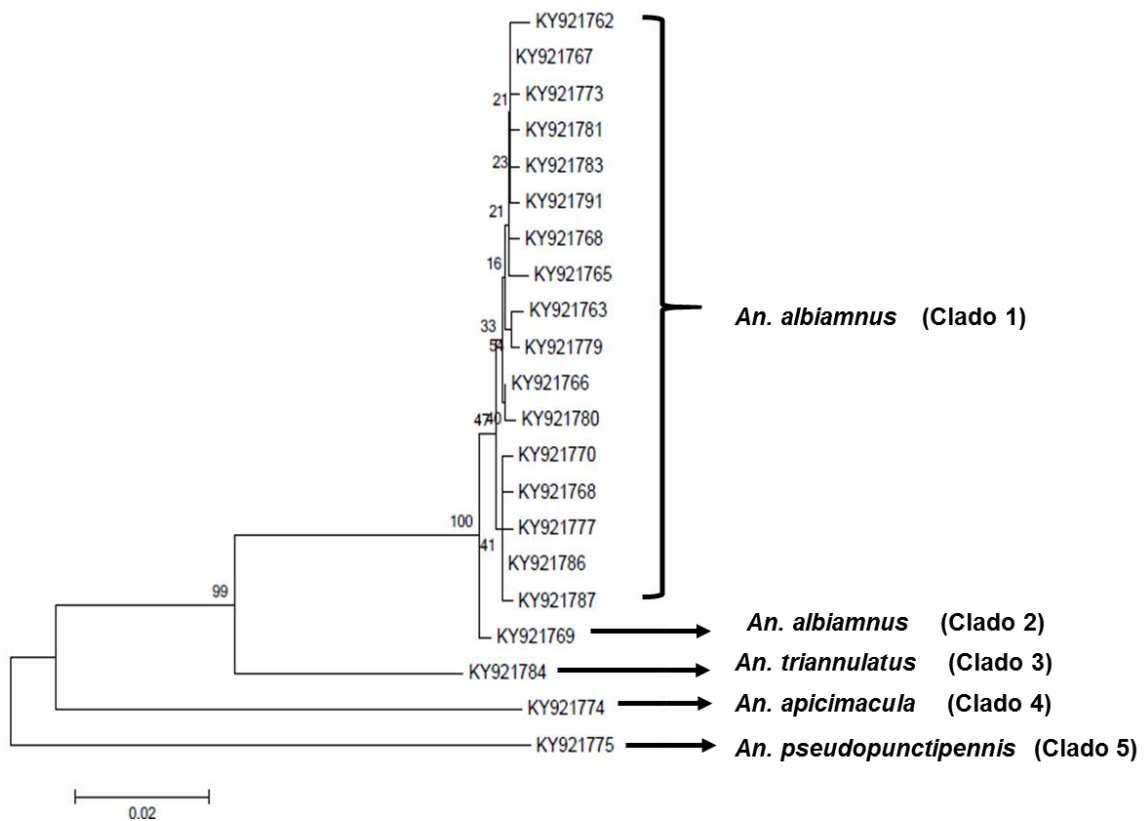
Tabla 3-3: Frecuencias de nucleótidos, correspondientes a todos los individuos pertenecientes a *Anopheles* spp. adultos secuenciados (n=31) de Turbo (Antioquia, Colombia).

		Transicional (TS%)	Transversiones (TV%)	T(U)	C	A	G	Total de bases
	Promedio	642,00	9,00	37,7	15,6	30,3	16,5	658,0
1st	206,00	7,00	7,00	43	4,3	49,1	3,1	220
2nd	217,00	2,00	0,00	27	15,5	27,9	30,1	219
3rd	219,00	0,00	0,00	43	26,9	13,7	16,4	219

Fuente: Elaboración propia.

El árbol de distancias (NJ) utilizando el modelo K2P (Figura 3-9), mostró cinco clados: Clado 1 *An. albimanus* (haplotipos n = 19: KY921762-63-65-66-67-68, 770-71-73-77-79-80-81-83-85-86-87-89-91); Clado 2 *An. albimanus* (KY921769); Clado 3 *An. triannulatus* (KY921784); Clado 4 *An. apicimacula* (KY921774) y Clado 5 *An. pseudopunctipennis* (KY921775) (Figura 3-9). La distancia intraespecífica en *An. albimanus* fue de 0.004 (n=28; 21 haplotipos), La mayor distancia entre especies fue de 0.154 entre *An. triannulatus* (KY921784) y *An. apicimacula* (KY921774); la menor fue de 0.007 entre el clado 1 y clado 2 de *An. albimanus*. La variación total entre todas las secuencias fue de 0.026 (Tabla 3- 4).

Figura 3-9: Árbol NJ-K2P basado en 1000 réplicas, mostrando los valores Bootstrap, mayores al de 20%.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3-4: Distancias genéticas de *COI* (intra* y entre especies), pertenecientes a cuatro especies de mosquitos (n=32, 23 haplotipos). Veredas El Olleto y La Islita del municipio de Turbo.

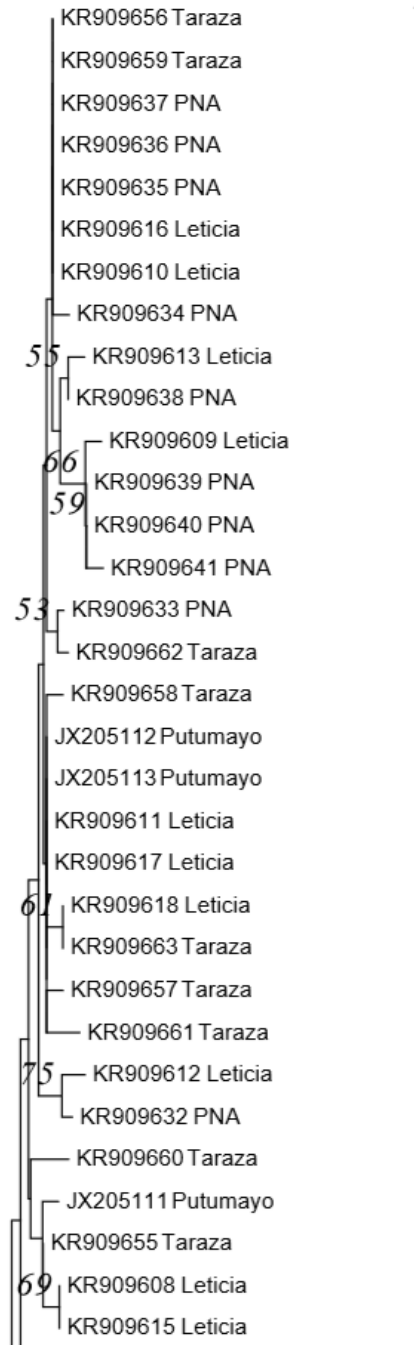
Especie	Clado 1	Clado 2	Clado 3	Clado 4	Clado 5
Clado 1 <i>An. albimanus</i> A	0,004*				
Clado 2 <i>An. albimanus</i> B	0,007	-			
Clado 3 <i>An. triannulatus</i>	0,138	0,137	-		
Clado 4 <i>An. apicimacula</i>	0,153	0,148	0,154	-	
Clado 5 <i>An. pseudopunctipennis</i>	0,076	0,072	0,129	0,146	-

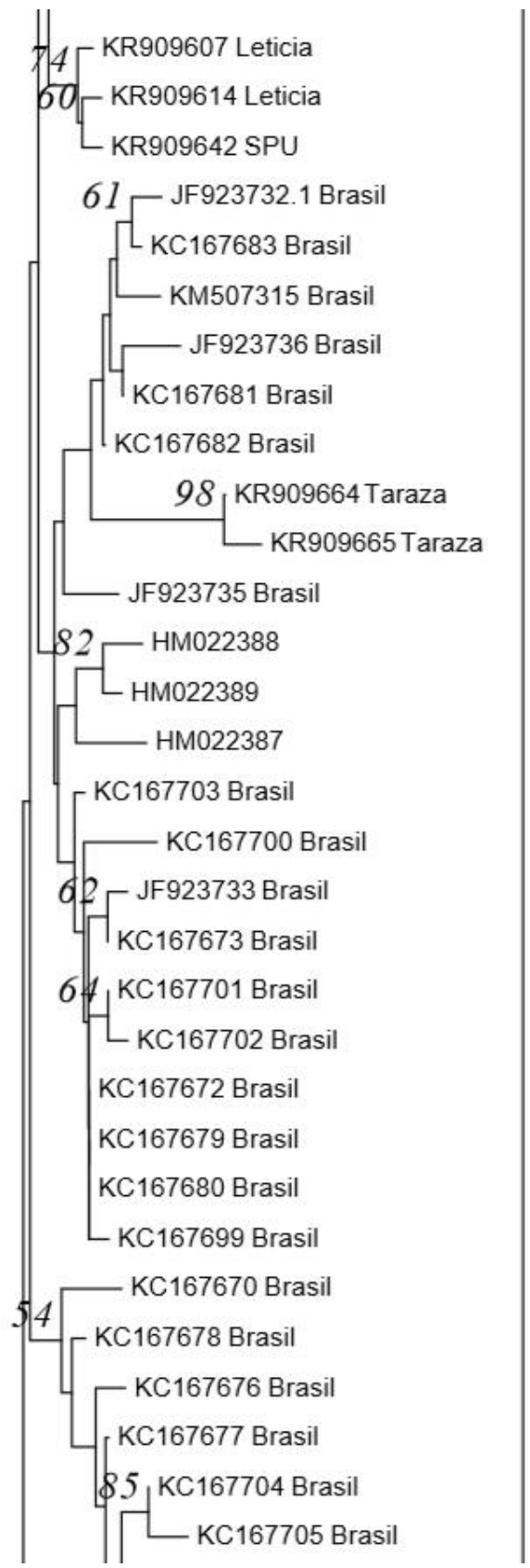
Fuente: Elaboración propia.

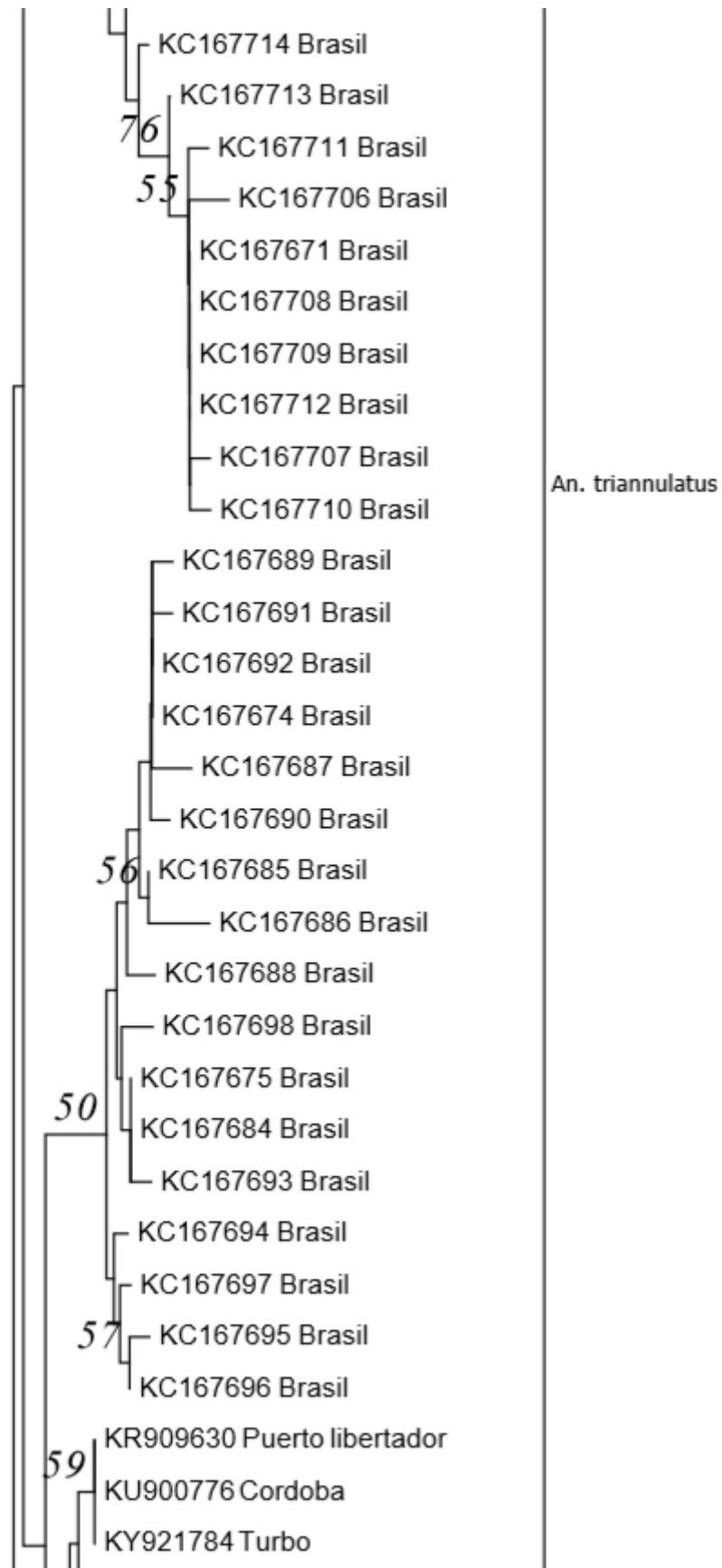
3.3 Comparación de secuencias con el GenBank

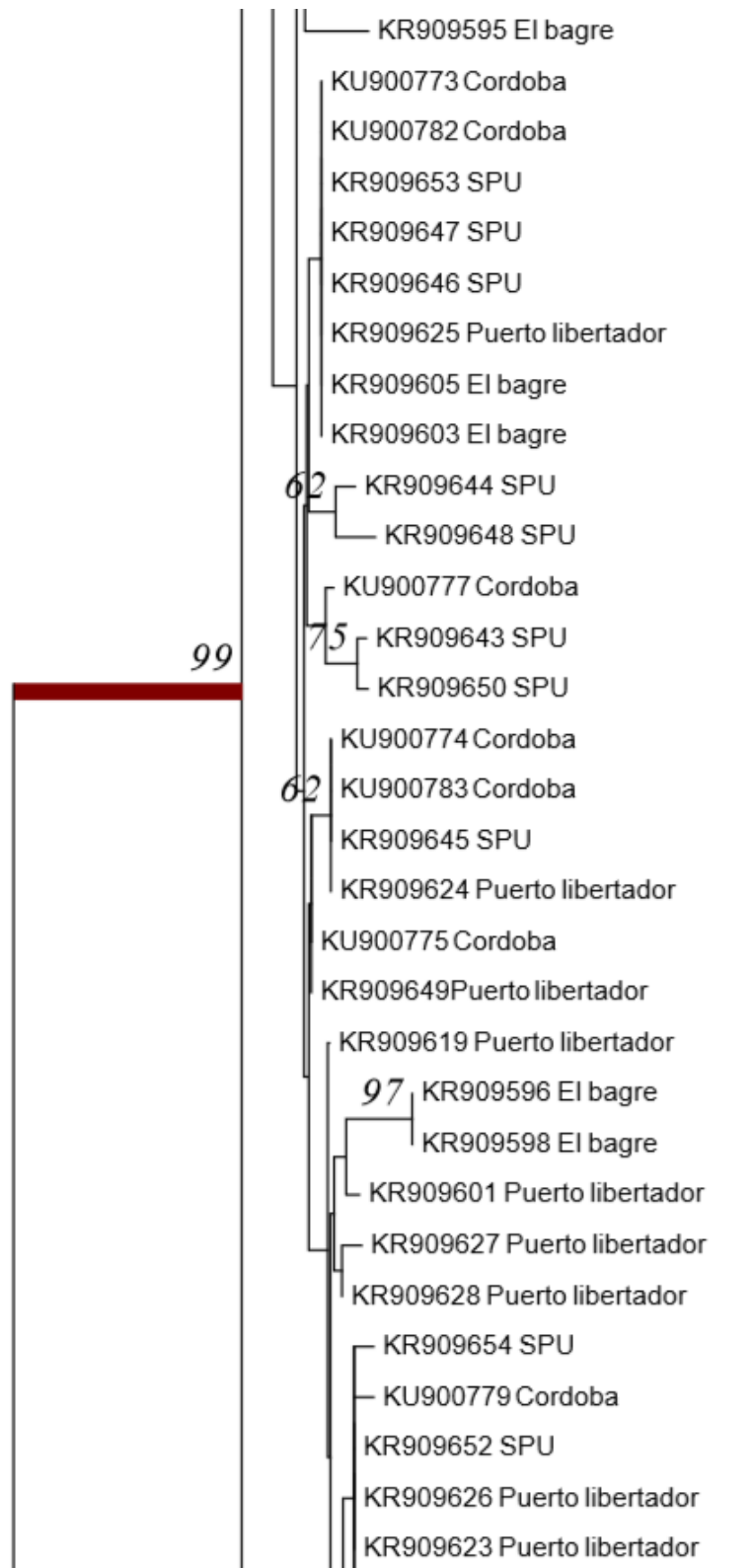
Como método inicial para confirmación de especie, se procedió a comparar nuestras secuencias, con las secuencias de *Anopheles* spp., depositadas en el GenBank y BoldSystem y posteriormente se construyó un árbol de distancias (NJ-K2P) (Figura 3-10).

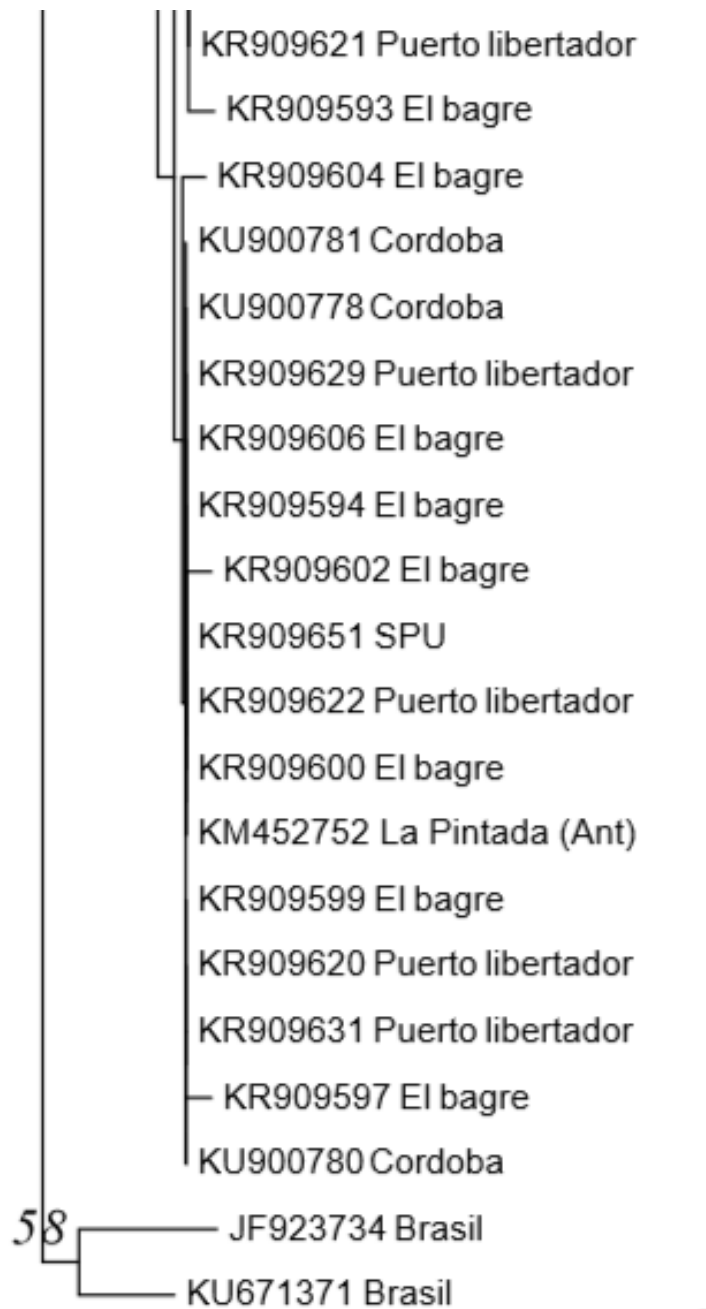
Figura 3-10: El árbol NJ-K2P está basado en secuencias propias y secuencias depositadas en el GenBank. Los valores inferiores al 70% no son mostrados. Las secuencias de GenBank se muestran con números de acceso. Todas las secuencias fueron recortadas a 658 pb

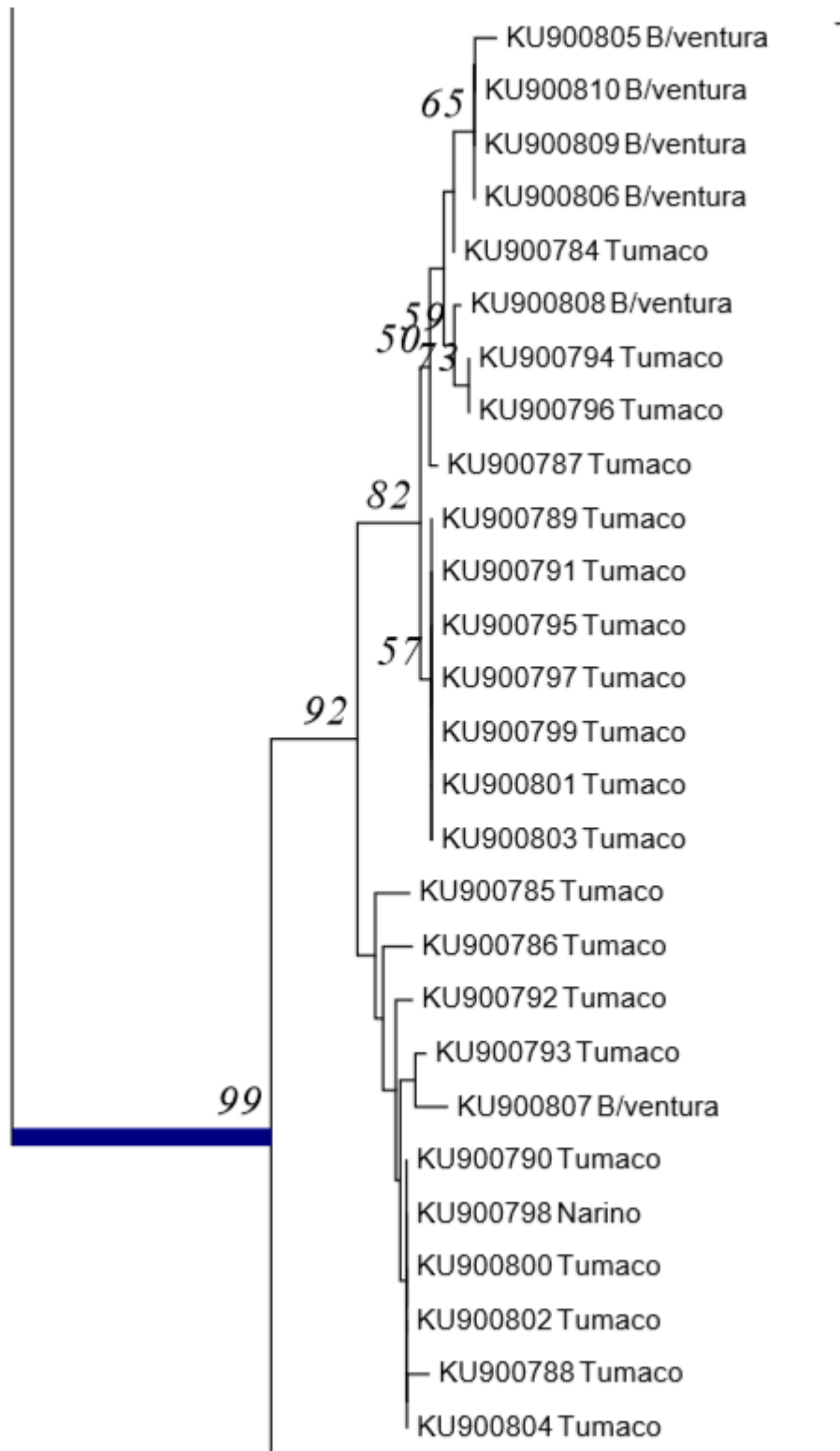


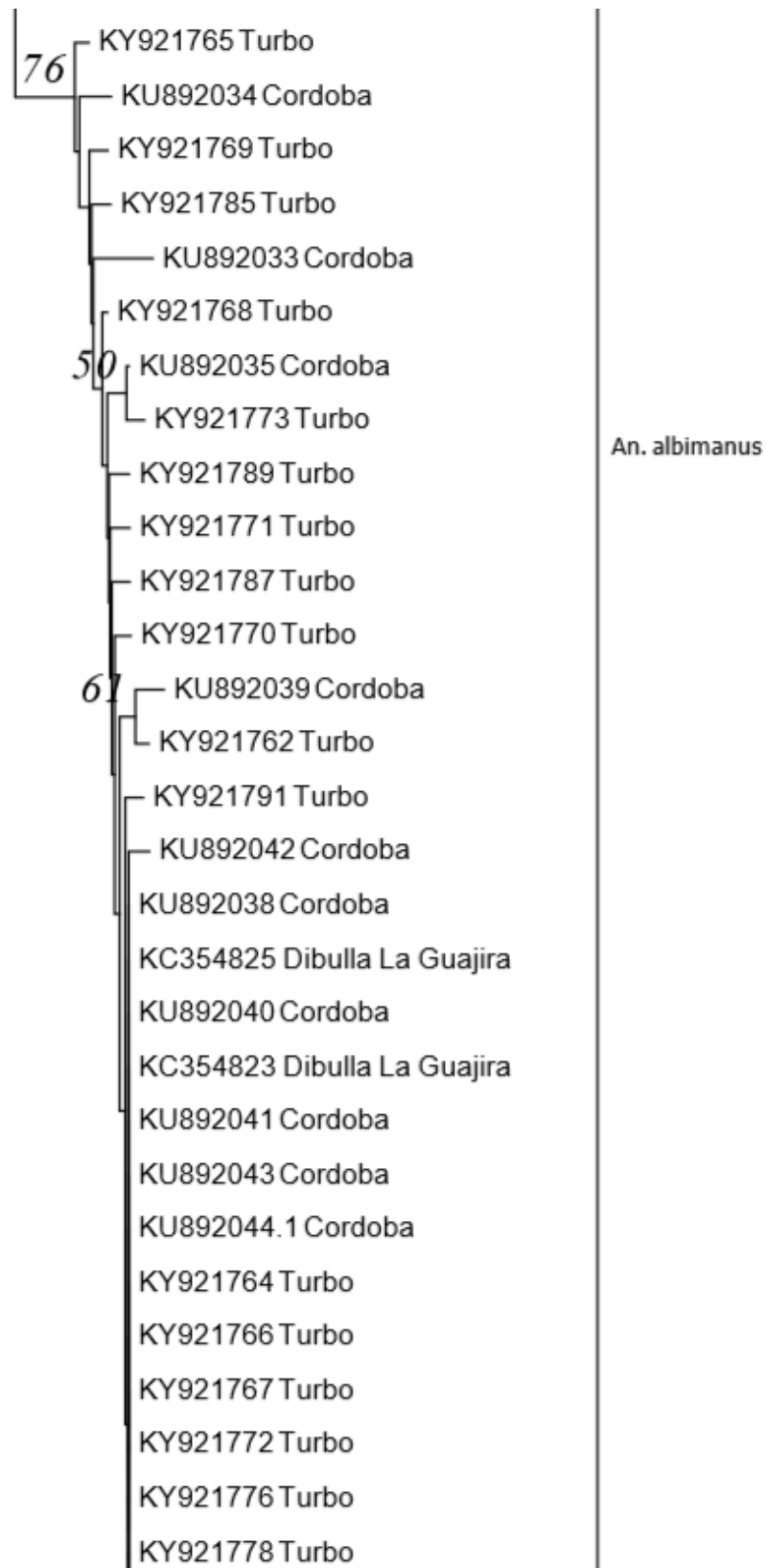


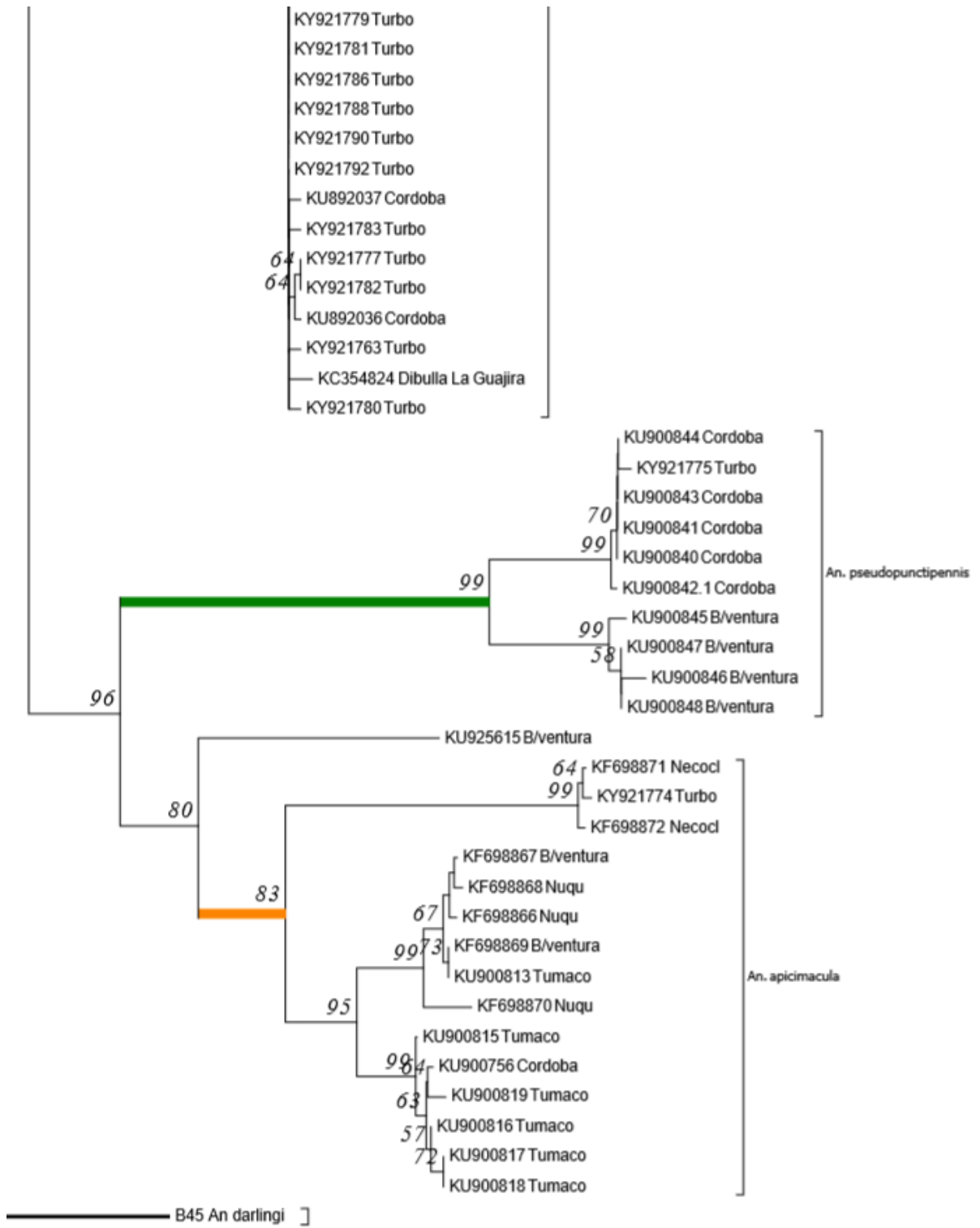












Fuente: Elaboración propia producto de los resultados encontrados.

Los *An. albimanus* identificados usando caracteres morfológicos, mostraron un alto porcentaje de identidad (99% y 98%), con secuencias de *An. albimanus* de la región norte de Colombia, departamentos de Córdoba y La Guajira: KU892033-41 (99%) (78); KC354823-24 (99%) (79) y de la región sur del departamento de Nariño: KU900785-790 (98%) (78). También hay una homología del 97% con secuencias de la Costa del Pacífico sur del departamento de Nariño: KU900784-94 y Valle del Cauca KU900805-808 (78).

Anopheles triannulatus, tuvo una homología del 99% con secuencias de mosquitos del departamento de Córdoba, Colombia KU900773-780 (78); secuencias del departamento del Putumayo: JX205112 (20); y secuencias de mosquitos del municipio de la Pintada en Antioquia: KM452752 (80); e identidad del 98% con secuencias de los estados de Bahía-Brasil: KU671371 (81), Sao Pablo (Amapa) Brasil: JF923733, (28) y Sao Pablo (Espíritu Santo) Brasil: JF923734 (28); KC167670-79; 681-97; 700-05; 708; 713-14 Amazonía (Brasil), además, se encontró una identidad del 97% con otras secuencias del Brasil KC167712 (82).

Cuando comparamos nuestra secuencia de *An. apicimacula* con las secuencias presentes en el GenBank (BLAST), un total de dos especímenes presentaron homología entre 99% y 98% con nuestro espécimen: *An. apicimacula* colectado en Necoclí (Antioquia): KF698871-72 – 99% (54). Además, se encontró un total de 14 secuencias de *An. apicimacula* con una homología alrededor del 93% (Tabla 3-5), con los siguientes códigos: KF698866-67-68-70, Nuquí-Chocó (54); KU900813-15-16-18-19, Tumaco-Nariño (78); KU900756, Tierralta-Córdoba (78); KU925615, Buenaventura- Valle del Cauca (78).

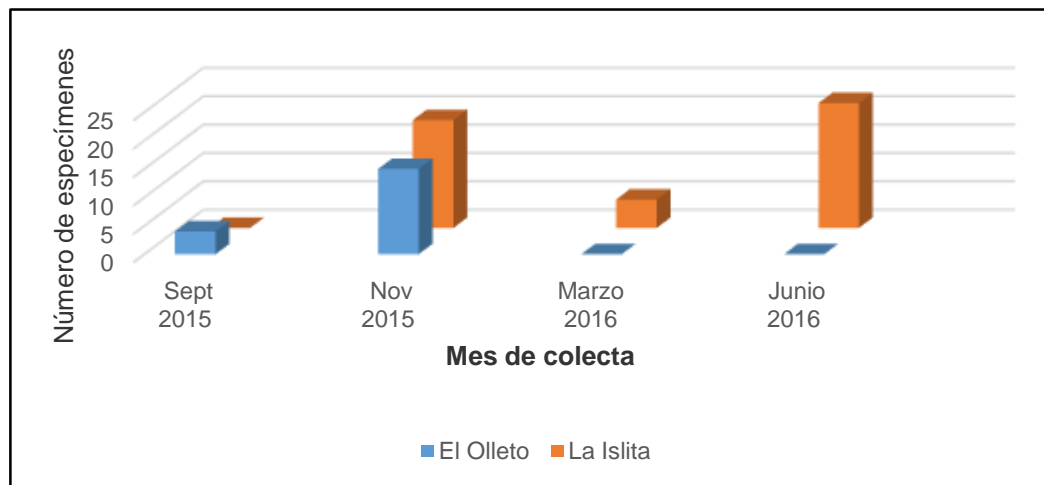
Los especímenes determinados como *An. pseudopunctipennis*, mostraron una identidad con secuencias del GenBank con mosquitos del departamento de la Guajira-Dibuya: KC354819 (99%) (79); secuencias del departamento de Antioquia, municipio El bagre KF698878 (99%) (54); secuencias del departamento

de Córdoba KU900834-36-38 (99%) (78); secuencias del departamento de Córdoba KU900835-37 (98%) (78); e identidad del 96% con secuencias del departamento del Valle del Cauca, municipio de Buenaventura KU900845 (96%) (78).

3.4 Identificación morfológica de inmaduros

Se colectaron 65 larvas de anofelinos, que correspondieron a *An. albimanus* s.s., *An. triannulatus* s.l.y *An. apicimacula* s.l. (Figura 3-11 y Tabla 3-5). En la Figura 3-12, se presenta un mapa discriminando especies de mosquitos y larvas colectados en cada una de las veredas.

Figura 3-11: Especies de *Anopheles* en estadio larval identificadas por morfología en cada vereda.



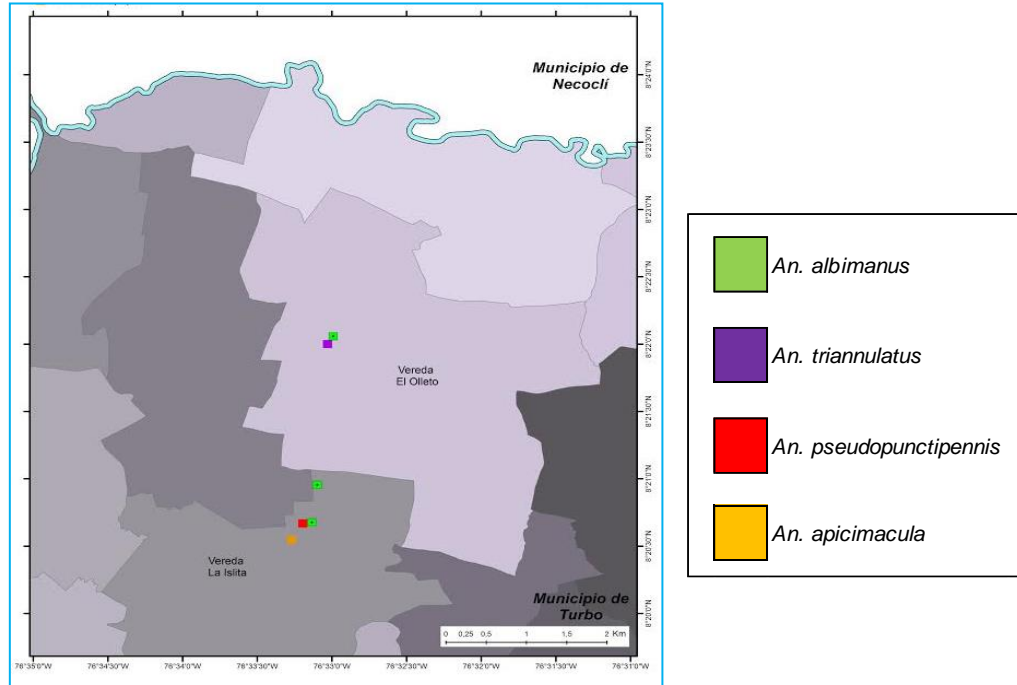
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3-5: Número total de larvas de *Anopheles* colectadas en cada vereda.

Especie	El Olleto	La Islita	Total
<i>An. albimanus</i>	18	40	58
<i>An. triannulatus</i>	1	-	1
<i>An. apicimacula</i>	-	6	6
Total	19	46	65

Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-12: Mapa discriminando especies de mosquitos y larvas recolectados en cada una de las veredas



Fuente: Elaboración propia.

3.5 Identificación de sitios de cría para *Anopheles* spp.

En la vereda La Isleta, fueron encontrados siete estanques (Jagüeyes) y en El Olleto cuatro estanques (Jagüeyes), todos permanentes creados por la comunidad para poder proveerse de agua, tanto para la comunidad como para los animales. La profundidad máxima fue de tres metros y un área aproximada de 50m a 200m. Todos los criaderos estaban expuestos al sol y tenían vegetación emergente de *Hydrilla* spp. y otros cubiertos por hojarasca de la vegetación circundante (Figuras 3-13, 3-14); de los once criaderos, solo en seis, tres en cada vereda, se obtuvieron larvas de mosquitos.

En la vereda el Olleto, se recolectaron 19 larvas que correspondieron a *An. albimanus* (n=18, 94. 7%) y *An. triannulatus* (n=1, 5.26%), y en la vereda La Isleta, se recolectaron 46 larvas correspondientes a *An. albimanus* (n=40, 87%) y *An. apicimacula* (n=6, 13%). En estas veredas, no se recolectaron larvas ni pupas de la especie *An. pseudopunctipennis*.

Figura 3-13: Estanques de la vereda La Isleta, municipio de Turbo.



Fuente: Foto tomado por Boris Zuleta, 19/06/2015

Figura 3-14: Estanque en la vereda El Olleto, municipio de Turbo.



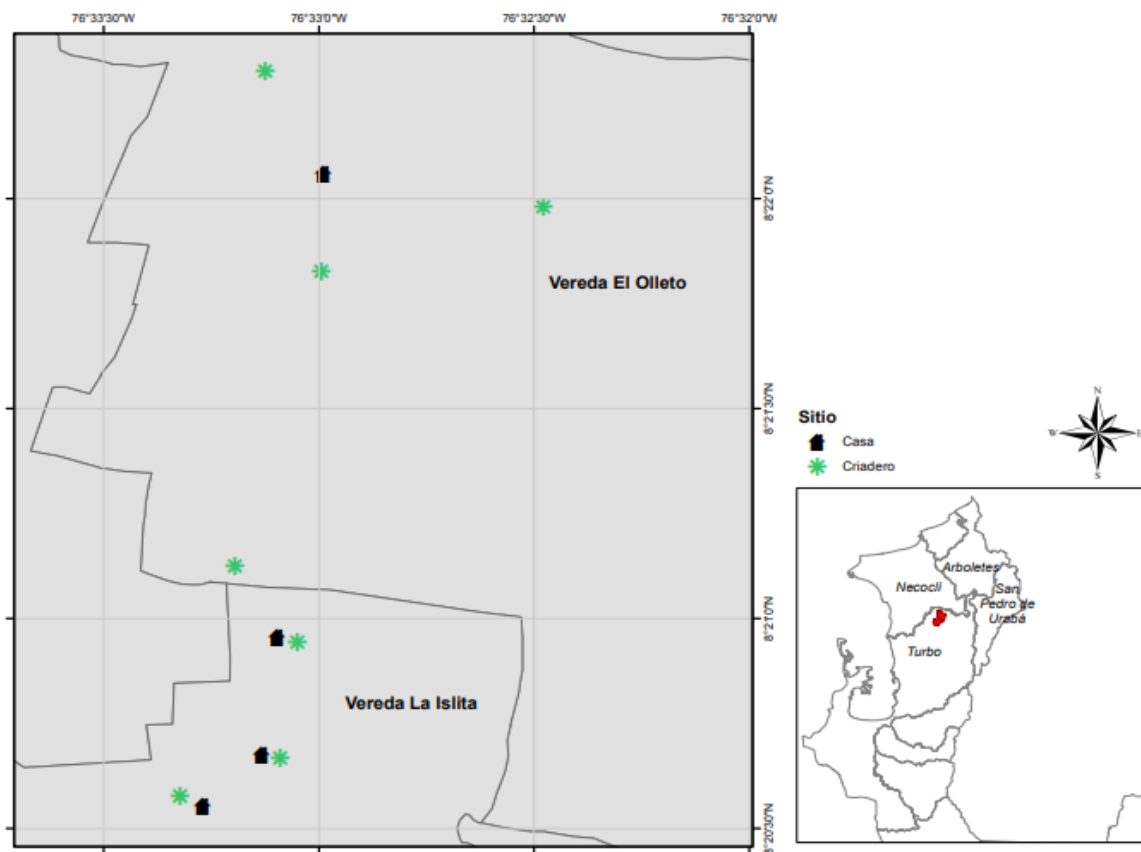
Fuente: Foto tomado por Boris Zuleta, 19/06/2015

En la vereda El Olleto, la temperatura del agua oscilo 25.8 34.1 C°, un pH entre 7.66 y 8.43, una conductividad entre 150 y 157.3 us/cm y el oxígeno disuelto de 6.52 a 8.93mg/L, como se identifica en la Tabla 3-6.

En la vereda La Islita, los parámetros de temperatura del agua oscilo 28.2 a 36.2 °C, el pH 7.4 a 7.6; conductividad 165 a 307us/cm y oxígeno disueltos entre 6.28 y 7.91 (Tabla 3-6).

Se colectaron un promedio de uno a tres larvas por cucharon; siendo estas de I, II y III estadio (Figura 3-15).

Figura 3-15: Mapa de estaciones de muestreo georreferenciadas en las veredas El Olleto y La Islita, Municipio de Turbo.



Fuente: Elaboración propia, programa ArcGIS 10.6.

Tabla 3-6: Parámetros de las características fisicoquímicas del agua de los estanques evaluados.

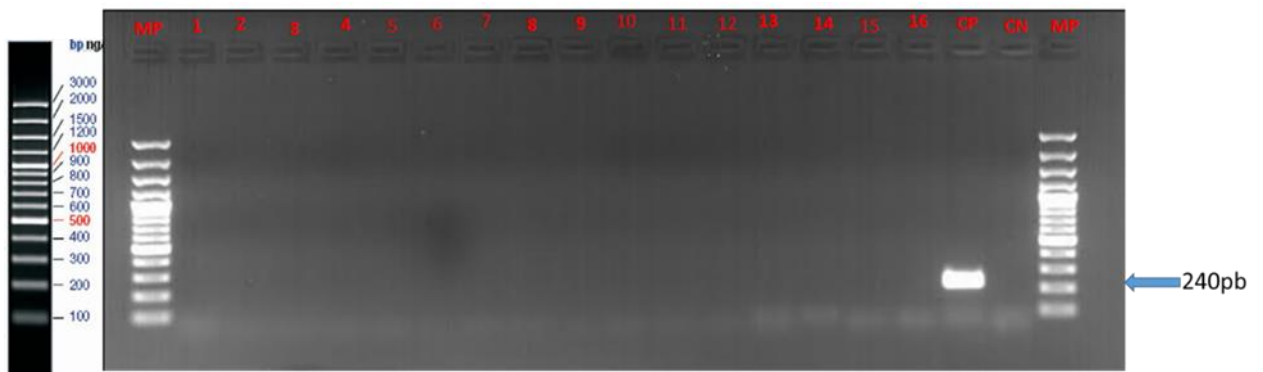
Localidad	Distancia a vivienda mas cercana	Temperatura del agua (C°)	pH	Conductividad	Oxígeno disuelto	N° de larvas
El Olleto	210	32,2 a 34,1	8.43	157,3us/cm	8.93mg/L	5 <i>An. albimanus</i>
	100	32,2 a 32,6	7.91	150us/cm	6.52mg/L	10 <i>An. albimanus</i>
	80	25,8a 32,1	7.66	155,8us/cm	6.94mg/L	3 <i>An. albimanus</i> , 1 <i>An. triannulatus</i>
La Isleta	100	28,2 a 28,6	7.4	307us/cm	7.29mg/L	16 <i>An. albimanus</i> , 6 <i>An. apicimacula</i>
	50	33,3 a 34,1	7.4	259us/cm	7.91mg/L	6 <i>An. albimanus</i>
	85	35,9 a 36,2	7.6	165,3us/cm	6.28mg/L	18 <i>An. albimanus</i>

Fuente: Elaboración propia

3.5.1 Infectividad

La prueba de PCR anidada (77), que se realizó para evidenciar la infectividad natural con *Plasmodium* spp. de los mosquitos colectados en la zona de estudio, no mostró amplificación de alguno de los pools de mosquitos sometidos (Figura 3-16).

Figura 3-16: PCR anidada de Snounou para la amplificación de género (*Plasmodium* spp). Carriles 1 al 16 pool de *Anopheles albimanus*. CP: Control positivo de *P. falciparum*. CN: *Anopheles* sp. no infectado.



Fuente: Elaboración propia producto de los resultados encontrados.

4. Discusión

La dirección Departamental de Salud de Antioquia, tiene a *An. albimanus* como uno de los principales vectores de malaria en la región de Urabá, y al municipio de Turbo, como uno de los municipios del departamento que más casos de malaria aporta anualmente. En las veredas estudiadas, no hubo colectas en trampa CDC, todos los insectos se colectaron en atrayente humano protegido y cebo animal. Se identificaron cuatro especies: *Anopheles albimanus* s.s., *An. triannulatus* s.l., *An. apicimacula* s.l y *An. pseudopunctipennis* s.l.

Anopheles albimanus es considerado uno de los principales vectores de malaria en la Américas (17,18,49). Fue la especie más abundante en las dos veredas (96.6%), se colectaron picando al hombre en el peridomicilio entre las 18:00-20:00 horas (Figura 3-1), momentos en que los pobladores, se encuentra expuesta y más desprotegida, realizando actividades de esparcimiento en el peridomicilio, posiblemente esta especie, también sea el principal vector de malaria en las veredas estudiadas, ya que fue la especie más frecuente en las dos localidades, tanto en formas inmaduras como adultos (Figura 3-2, Tabla 3-5). Esta especie se registró en todos los meses de colecta, sus mayores densidades se presentaron en época de lluvia en los meses de septiembre y noviembre (Figura 3-1, Tabla 3-1), ratificando lo hallado por Rubio-Palis (83), donde dice que la distribución de *An. albimanus*, coincide con lugares con época de lluvia de las regiones. Se esperaría que en época de lluvias aumente el número de criaderos, por consiguiente, las fuentes de alimento para larvas. En estas épocas del año, son en las que se deben de generar estrategias de control vectorial en las localidades estudiadas, debido a que, con altas densidades de mosquitos vectores en las comunidades, sólo es necesario la presencia de una persona

infectada con *Plasmodium* spp., para que se genere un brote de transmisión de malaria. Las otras especies colectadas en menor densidad, pueden ser estacionales y podrían actuar como vectores si las condiciones cambian y le son favorables para su desarrollo.

Algunos autores, han demostrado la presencia de *An. albimanus* en altitudes bajas y áreas costeras, en criaderos de aguas salobres (18,84,85), sin embargo otras investigaciones han dado cuenta de la presencia de esta especie en altitudes no costeras (86). Sugiriendo que esta especie se puede adaptar a condiciones diferentes de las usualmente reportadas (86). Las localidades estudiadas se encuentran aproximadamente a 26 Km del Océano Atlántico, confirmando estudios anteriormente descritos, donde los criaderos encontrados, fueron completamente de aguas dulces, utilizados para consumo humano y animal.

En el país, no se considera a *An. triannulatus* vector de malaria (87), a pesar de haberse encontrado infectado naturalmente en otro municipio del departamento de Antioquia (21,88). Esta especie, tiene hábitos antropofílicos identificados por Brochero (89), quien reporta para el municipio de Cimitarra (Santander), una actividad de picadura entre las 20:00 y 21:00 horas; varios investigadores dicen que esta especie es altamente antropofílico, alimentándose de las personas por fuera de las viviendas (83); otros estudios indican que esta especie tiene hábitos alimenticios zoofílicos (62,88). Durante este estudio, se colectó un individuo en atrayente animal (cerdo) en la vereda El Olleto, entre las 20:00 y 21:00 horas, durante época de lluvia (Tabla 3-1). La baja densidad $\leq 1\%$ en este estudio, y no antropofilia, no permiten evaluar su tasa de picadura, ni comprobar su infectividad; *An. triannulatus* s.l. colectado en esta vereda, podría ser vector local, sin embargo, esto se tendría que esclarecer con otros estudios que se podrían diseñar en la región, ampliando el área de colecta y otras épocas del año.

Anopheles apicimacula s.l. a pesar de su amplia distribución y frecuente en áreas maláricas, no ha sido incriminada de manera concluyente como vector de malaria; en Puebla-México fue catalogado como sospechoso de ser el responsable de la transmisión de malaria en el estudio de Martínez-Palacio en 1960, citado por Rodríguez *et al.* (90), sin embargo, en las Américas, incluyendo Colombia, no hay otros estudios que la impliquen en transmisión de malaria. En las veredas estudiadas, se colectó un único individuo picando al hombre entre las 19:00 y 20:00 horas en el peridomicilio, durante la temporada seca (Figura 3-1), esta especie no se colectó en cebo animal, aunque en todos los sitios de muestreo tenían animales de corral. Esta especie es catalogada por Fajardo *et al.* (91) como muy zoofílico, también dice que en lugares donde los animales domésticos son pocos, esta especie puede verse obligada a alimentarse de los humanos, lo que sería un riesgo, ya que se encontró picando al hombre y potencialmente transmitir malaria.

Anopheles pseudopunctipennis es reconocida como uno de los principales vectores de malaria en América (92,93). En Colombia, se ha encontrado infectado con *Plasmodium* spp., siendo catalogado como vector esporádico, local o regional de malaria (61). Durante este estudio se recolectó un solo ejemplar $\leq 1\%$ de *An. pseudopunctipennis* s.l. con atrayente humano en el peridomicilio entre las 19:00 y 21:00 horas (Figura 3.1), no se sabe a qué especie del complejo pertenece, lo que suscita problemas en la epidemiología de la malaria en la región, aunque esta especie ha sido catalogada de hábitos zoofílicos (94), es posible que por estar los corrales cerca de las casas, estos aprovechen la oferta que se les presenta en las personas que se encuentran descansando, lo que sería un riesgo inminente, estaría mostrando más consistencia con actividades de antropofilia.

Las veredas donde se desarrolló este estudio, podrían estar en riesgo con este insecto como potencial vector de malaria, esta situación, ameritaría que se realizaran estudios que impliquen tasa de picadura, infectividad, estatus taxonómico y papel vectorial en la región.

Zapata *et al.* (95) en estudio realizado en San Pedro de Urabá, municipio limítrofe con los municipios de Turbo y Necoclí, reportó a *An. nuneztovari* como el vector principal, con un 64.8%, la presencia de *An. albimanus* fue menor con 3.4%, *An. triannulatus* con 4.2% y *An. pseudopunctipennis* con 1.2%. Mientras que Gutiérrez *et al.* (60) reportó en Turbo a *An. albimanus* en un 96.6%; *An. pseudopunctipennis* en un 1.1%, datos similares a los hallados en esta investigación. Los anteriores resultados evidencian que *An. albimanus* no siempre puede ser el principal vector de malaria en una región, esta especie en simpatria con una especie altamente antropofílica, como lo es *An. nuneztovari*, podría pasar a ser un vector secundario. En este estudio la mayor tasa de picadura fue de las 18:00-20:00 horas (Figura 3.10), tiempo en que las personas están más expuestas, ya que es un momento de descanso y siguen estando activas y sin protección, y donde posiblemente los toldillos como métodos de control, no serían efectivos.

Es importante aclarar el papel vectorial que las especies de *Anopheles* spp. tienen en la transmisión de malaria en Antioquia, donde los vectores primarios pueden cohabitar vectores secundarios, o con vectores potenciales (23,84). Se ha observado, que la distribución de las especies cambia temporalmente en relación a las variaciones climáticas que experimenta cada región (96), además, otros estudios llaman la atención, de que además de las condiciones medioambientales, hay que sumarle las disposiciones culturales de cada región, que pueden influir en la epidemiología de la enfermedad (97).

Los hábitat de estadios inmaduros, sus características morfológicas y ecológicas facilitan información sobre abundancia y diversidad de las poblaciones de mosquitos (50). Según las temperaturas encontradas (25.8 a 32°C) (Tabla 3-6), en los criaderos evaluados, existen unas condiciones que pueden estar generadas por producción de algas, condiciones que puede facilitar el desarrollo de diferentes especies de artrópodos, entre ellos los mosquitos como *An. albimanus* (98,99), es posible que estas condiciones estén favoreciendo a *An.*

albimanus s.s. y no a *An. triannulatus* s.l. y *An. apicimacula* s.l. Además, *An. albimanus* s.s., es considerada una especie que puede adaptarse a criaderos en función de las precipitaciones y de la acción antrópica, y que busca reservas de agua para uso doméstico (83,100). En esta investigación, se encontró los criaderos de *An. albimanus*, en aguas completamente dulces y en simpatria con *An. apicimacula* s.l. y *An. triannultus* s.l. (Figura, 3.12; Tabla 3.5). Estos criaderos presentaron otras especies de insectos acuáticos, pertenecientes a la familia Notonectidae, conocido como un buen depredador de larvas de mosquitos (101).

En este estudio se pudo observar baja densidad y diversidad de especies, según con lo reportado en Conn *et al.* (102), probablemente obedece a cambios presentes a condiciones ecológicas y ambientales, o a las mismas actividades humanas, una de ellas es el control químico y biológico de los criaderos, posiblemente por las acciones realizadas por la Dirección Seccional de Salud de Antioquia (DSSA) sede Urabá, que periódicamente visita la zona realizando jornadas de aspersión con K-Othrine y tratamiento de los Jagüeyes con el biolarvicida *Bacillus sphaericus*; en consecuencia disminuyendo de manera considerable las poblaciones de mosquitos. Este control biológico ha sido usado con efectividad en otros países, con resultados bastante importantes en la disminución de los vectores de malaria (103,104), al parecer, este método de control es más eficiente con respecto a los métodos de control existentes para el estado adulto (98).

Por la forma de reproducción de los mosquitos, se esperaría que estas fuentes de agua fueran aptas para la crianza de mosquitos, ya que estas provienen de aguas de escorrentía, con exposición al sol (98) y vegetación emergente que sirve como refugio de las larvas (105), situación que favorece la proliferación de estadios inmaduros de mosquitos. Lo que se puede observar en cada uno de los jagüeyes evaluados. La poca productividad larvaria, está estrechamente relacionado con las densidades de adultos colectados, al parecer las condiciones fisicoquímicas puede ser un factor para el desarrollo larval, las poblaciones de mosquitos se

encontraron a pH básico y a una temperatura del agua de 25 a 36 °C, las condiciones de pH en este estudio oscilaron entre 7.4 y 8.4 (Tabla 3.1). Aunque las condiciones del suelo (acidificación) y uso del suelo (desforestación, tipos de cultivos, ganadería), no se tuvieron en cuenta, no es de descartar que tengan influencia en las condiciones fisicoquímicas del agua.

Las larvas de *An. pseudopunctipennis*, está más asociado a las orillas de los ríos que de otro tipo de criadero, siendo más abundante en época de lluvia en criaderos donde hay presencia de algas filamentosas y algas verdes (98).

En la actualidad, la DSSA continua con los programas de prevención que consiste, en entrega de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración y control de los insectos vectores adultos e inmaduros en los lugares de mayor incidencia de la enfermedad en el departamento, donde está incluido el municipio de Turbo.

El principal agente etiológico de malaria en el municipio de Turbo, es *Plasmodium vivax*, siendo *An. nuneztovari* principal vector en la región. Los resultados de infectividad realizados para los mosquitos colectados, no arrojó positividad alguna, pero por la abundancia en ambas veredas de *An. albimanus* s.s., no se descarta que sea el que esté transmitiendo *Plasmodium* sp. en las veredas de estudio. En estas veredas probablemente la hora de mayor riesgo de contraer malaria, sea entre las 18:00 y 21:00 horas (Tabla 3-1).

Se pudo confirmar la identidad de las especies colectadas en este estudio a través de un fragmento del gen *COI*, esto demuestra la eficacia de la metodología, la cual en conjunto con la observación de los caracteres morfológicos de los diferentes estadios, se constituye en una herramienta útil que ayuda a la identificación de especies pertenecientes a complejos (20), sin embargo, aún hoy hay complejos que no han sido resueltos, como *An. triannulatus* s.l, *An. apicimacula* s.l. y *An. pseudopunctipennis* s.l.

Anopheles albimanus s.s., mostró dos clados, uno en la costa Atlántica y otro en la costa Pacífica, las secuencias que arrojó esta investigación se distribuyeron con los de la costa Atlántica, departamentos de Córdoba y La Guajira (Figura 3-10). Las secuencias pertenecientes a mosquitos de la costa del Pacífico: Valle del Cauca y Nariño, han sido denominadas *An. albimanus* B (78), mostrando que hay diferencias importantes y afirmando que es posible que en el país haya dos poblaciones que se están diferenciando (Figura 3-10). Esta situación ameritaría estudios más robustos de estas poblaciones, para aclarar el estatus de cada una de ellas, y sus implicaciones en la transmisión de malaria.

De la misma manera, surge la evidencia para apoyar el argumento de que hay dos linajes de *An. pseudopunctipennis*, con diferente distribución geográfica, se encontró que el individuo que se colectó en la vereda La Islita *An. pseudopunctipennis* s.l., se alineó con secuencias del Noreste (Córdoba), los cuales difieren y están separados, con secuencias de Buenaventura como se observa en el dendograma (Figura 3-10). Ha habido investigaciones que han buscado evaluar el estatus taxonómico de esta especie. Estrada *et al.* (59) usó enzimas de restricción (PCR-RFLP) del ADNr y Coetzee *et al.* (36) usó apareamiento cruzado, y pruebas de citogenética, sugirieron que esta especie era un complejo de al menos tres especies: *An. pseudopunctipennis* A (México); *An. pseudopunctipennis* B (Perú y Bolivia) y *An. pseudopunctipennis* C (Granada y Antillas menores) (36). Sin embargo, Manguin *et al.* (57) sugiere que *An. pseudopunctipennis* es una sola especie con tres poblaciones geográficas diferentes, la primera cubre a (EEUU y México), la segunda Bécica y Suramérica (Colombia, Ecuador, Perú, Chile y Argentina) y la tercera (Granada). Nuestras secuencias se agruparon con las poblaciones de norte de Colombia, Córdoba.

En cuanto a *An. apicimacula* s.l., el análisis NJ, respaldan la hipótesis de la existencia de cuatro linajes (Urabá, Nuquí, Tumaco y Buenaventura) (Figura 3-10). Gómez *et al.* (54) había sugerido la existencia de dos linajes (costas Atlántica y Pacífica) y que posiblemente un tercer linaje. El dendograma

muestra que estos linajes son altamente compatibles, el primer linaje de Buenaventura, el segundo Región Urabá, un tercer linaje secuencias de Nuquí, Buenaventura y Tumaco, y un cuarto linaje: Tumaco y Córdoba (Figura 3-10). La secuencia del presente estudio de *An. apicimacula* s.l. es altamente compatible con secuencia de Necoclí, municipio cercano a las veredas donde se realizó este estudio.

Con respecto a *An. triannulatus* s.l., el análisis NJ muestran varios linajes, mostrando que esta especie exhibe una amplia distribución en el país y Brasil, que seguramente con muchas diferencias, esta distribución se presenta desde el Sur y Sureste (Putumayo, Leticia) hasta la cordillera de los Andes (Tarazá, Zaragoza, El Bagre) y costa Caribe (Urabá, Córdoba) (Figura 3-10). Esto indica que se requieren una amplia gama de muestras de diferentes poblaciones para poder establecer qué especies del complejo pueden estar en Colombia. Actualmente *An. triannulatus* es un complejo de al menos tres especies: *An. triannulatus* s.s., *An. triannulatus* C y *An. halophylus*. Moreno *et al.* (34) sugiere que *An. halophylus* y *An. triannulatus* C se encuentran en proceso de especiación incipiente. Nuestro *An. triannulatus* s.l. se agrupo con las secuencias de Colombia, confirmando los resultados anteriormente descritos, no obstante, estudios de morfología de la genitalia del macho, y la utilización de otros marcadores moleculares, son necesarios para esclarecer el número de especies presentes en este complejo.

Debido a las especies encontradas en esta investigación, la vigilancia epidemiológica en las veredas estudiadas, debería de ser constante, ya que las actividades humanas y el cambio climático, pueden tener un impacto en la distribución geográfica y temporal de los vectores (106).

Conclusiones

Se evidencia la presencia de dos vectores importantes en la zona como lo son *An. albimanus* s.s. y *An. pseudopunctipennis* s.l., así como dos vectores potenciales *An. apicimacula* s.l. y *An. triannulatus* s.l. ya que se han encontrado infectados y picando al hombre. Igualmente, la presencia de tres especies que son miembros de complejos de especies *An. pseudopunctipennis* s.l. (Complejo Pseudopunctipennis) y *An. triannulatus* s.l. (Complejo Triannulatus) y *An. apicimacula* s.l. (Complejo Apicimacula).

Es posible que la abundancia de *An. albimanus* s.s. encontrada en este estudio, haya sido favorecida por el tipo de vegetación asociada a este tipo de criaderos, pero al mismo tiempo, las bajas densidades larvarias encontradas, puedan ser producto de condiciones antrópicas, como la aplicación de *Bacillus sphaericus* que a los condiciones bióticas y abióticas presentes.

A pesar de haber encontrado *Anopheles* spp., que tienen antecedentes de infección en otras regiones de Colombia y Suramérica, en este estudio no hubo mosquitos infectados, esto pudo suceder por varias razones: la primera por el bajo número de mosquitos colectados y dos, no está circulando el parásito en la población humana, asentada en las veredas estudiadas. Sin embargo, debido a la abundancia de mosquitos colectados de *An. albimanus* s.s. y su antropofilia observada, esta especie podría ser el principal vector de malaria en las zonas estudiadas.

Las condiciones de vida de los habitantes de las veredas estudiadas, la pobreza en que viven, el tipo de vivienda y la falta de servicios básicos, como el agua,

hacen de las veredas El Olleto y La Islita, de alto riesgo de transmisión de malaria, principalmente en las épocas de lluvia (donde aumentan el número de criaderos). Esta zona de vida, es el hábitat para varias especies de mosquitos *Anopheles* spp. vectores de malaria, los cuales solo necesitan picar una persona infectada con *Plasmodium* spp, para que se inicie un brote de malaria en la región.

Referencias Bibliográficas

1. **World Health Organization (WHO)**. World report malaria. Genova, 2018.
2. **Brasil P, Zalis M, Pina-Costa A, Machado-Piqueira M, Bianco-Junior C, Silva S, et al.** *Plasmodium simium* causing human malaria: a zoonosis withoutbreak potential in the Rio de Janeiro: Brazilian Atlantic Forest. 2017. p. 1038-1046.
3. **Lourenço-de-Oliveira R, Deane LM.** Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. Vol. 90, Memórias del Instituto Oswaldo Cruz. 1995. p. 331-339.
4. **Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM.** First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. Malaria Journal. 2014;13:13-68.
5. **Martínez-Salazar E, Tobón-Castaño A, Blair S.** Natural *Plasmodium knowlesi* malaria infections in humans. Biomédica. 2012;32:121-130.
6. **Centers for Disease Control and Prevention.** Malaria. Pagina Web. revisado 3 de julio 2017.
7. **SIVIGILA.** Casos totales de malaria en la semana epidemiológica 51 y acumulados del año. Bogotá; 2018.
8. **Vergara J, Hurtado V, Arévalo M, Herrera S.** Caracterización de la transmisión de *Plasmodium malariae* en cuatro regiones colombianas endémicas de malaria. Biomédica. 2001;21:53-61.
9. **Niño CH, Cubides JR, Camargo-ayala PA, Rodríguez-celis CA, Quiñones T, Cortés-castillo MT, et al.** *Plasmodium malariae* in the Colombian Amazon region: you don't diagnose what you don't suspect. Malaria Journal. 2016;15:376-86. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-016-1629-3>.

10. **Padilla J, Chaparro P, Molina K, Arevalo-Herrera M, Herrera S.** Is there malaria transmission in urban settings in Colombia? *Malaria Journal*. 2015;14:453.<http://dx.doi.org/10.1186/s12936-015-0956-0>.
11. **Carmona-Fonseca J.** La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 2. *Iatreia*. 2004;17: 34-53
12. **Harbach RE.** The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. Vol. 1668, *Zootaxa*. 2007. p.591-638.
13. **González R, Carrejo NS.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia, Claves taxonómicas y notas de distribución. Segunda ed. Cali: Universidad del Valle; 2009. p. 260.
14. **Harbach RE.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin Entomological Research*. 2004;94:537-53.
15. **Collucci E, Sallum MA.** Cladistic analysis of the subgenus *Anopheles* (*Anopheles*) Meigen (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102:277-91.
16. **Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al.** A global map of dominant malaria vectors *Information. Parasites & Vector*. 2012;5:1-11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>
17. **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón, Isabel G, Quiñones ML, Ruiz-López F, et al.** Malaria vector species in Colombia: A review. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106:223-38.
18. **Olano VA, Brochero HL, Sáenz R, Quiñones ML, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomedica*. 2001;21:402-408.
19. **Herrera S, Suarez M, Sanchez G, Quiñones M, Herrera M.** Uso de la técnica radioinmunoensayo IRMA en *Anopheles* de Colombia para la detección de esporozoitos de *Plasmodium*. *Colombia Medica*. 1987;18:2-6.
20. **Orjuela LI, Herrera M, Erazo H, Quiñones ML.** Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con *Plasmodium*. *Biomedica*. 2013;33:42-52. <http://dx.doi.org/10.7705.v33i1.619>.
21. **Naranjo-Diaz N, Rosero D, Rúa-Uribe G, Luckhart S, Correa M.**

- Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasites & vector*. 2013;6.
22. **Harrison BA, Ruiz-Lopez F, Falero GC, Savage HM, Pecor JE, Wilkerson RC.** *Anopheles* (Kerteszia) *lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*. 2012;1:1-17.
 23. **Quiñones M, Ruiz F, Calle D, Harbach R, Erazo H, Linton Y.** Incrimination of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *rangeli* and *An.* (*Nys.*) *oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101:617-623. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000600007>.
 24. **Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quíones ML, et al.** DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites and Vectors*. 2012;5. <http://dx.doi:10.1186/1756-3305-5-44>
 25. **Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quíones ML, et al.** DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites and Vectors*. 2012;5.
 26. **Dirección Seccional de Salud de Antioquia (DSSA).** Mapas de distribución de *Anopheles* del departamento de Antioquia. Medellín: DSSA; 2001.
 27. **Scarpassa VM, Cunha-Machado AS, Saraiva JF.** Evidence of new species for malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato in the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal*. 2016;15:205. <http://dx.doi:10.1186/s12936-016-1217-6>.
 28. **Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TMP, Nagaki SS, Sant'Ana DC, et al.** Phylogenetic Analysis and DNA-based Species Confirmation in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). *PLoS One*. 2013;8.doi/org/10.1371 journal pone0054063.
 29. **Mirabello L, Conn JE.** Population analysis using the nuclear white gene

- detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. *Medical and Veterinary Entomology*. 2008;22:109-19. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00731>.
30. **Sierra DM, Velez ID, Linton Y-M.** Malaria vector *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* comprises one genetic species in Colombia based on homogeneity of nuclear ITS2 rDNA. *Journal Medical Entomology*. 2004;41:302-7.
 31. **Conn J, Puertas YR, Seawright JA.** A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. *Journal of American Mosquito Control Association*. 1993;9:294-301.
 32. **Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Anice M, Sallum M, et al.** Systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles, Nyssorhynchus*) in South America *Parasites & Vectors*. 2013;6:324 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-324>.
 33. **Wilkerson RC, Foster PG, Li C, Mureb Sallum MA.** Molecular phylogeny of Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* species complex (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 2005;98:918-25.
 34. **Moreno M, Bickersmith S, Harlow W, Hildebrandt J, McKeon SN, Silva-Do-Nascimento TF, et al.** Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. *Parasites and Vectors*. 2013;6:1.
 35. **Silva-do-Nascimento TF, Wilkerson RC, Monteiro FA.** Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in Central Brazil. *Entomol Soc Am*. 2006;43:455-9.
 36. **Coetzee M, Estrada-Franco JG, Wunderlich CA, Hunt RH.** Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;60:649-53.
 37. **Estrada-Franco J, Ma M, Gwadz R, Sakai R, Lanzaro G, Laughinghouse A, et al.** Evidence through cross-mating experiments of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato: a primary malaria vector of the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

- 1993;49:746-55.
38. **Elliot R.** The influence of vector behavior on malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1972;21:755-63.
 39. **Kitzmiller J., Kreutzer R., Tallaferro E.** Chromosomal differences in populations of *Anopheles nuneztovari*. *Bulltin World Health Organization*. 1973;48:435-45.
 40. **Linley J, Lounibos L, Duzak D, Nishimura N.** A description and morphometric comparison of eggs from eight geographic populations of the South American malaria vector *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* (Diptera:Culicidae). 1996;12:275-92.
 41. **Scarpassa, Margarete, Tadei, Pedro, Suarez MF.** Allozyme differentiation among allopatric populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Genetics*. 1996;19:265-9.
 42. **Scarpassa, Margarete, Geurgas S, Azeredo-Espin AM, Tadei P.** Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. *Genetic and Molecular and Biology*. 2000;23:71-8.
 43. **Conn E. J, Mitchell SE, Cockburn AF.** Mitochondrial DNA analysis of the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari*. *Genome*. 1998;41:313-327:313-27. <https://doi.org/10.1139/g98-031>
 44. **Calado D, Foster PG, Bergo E, Dos Santos CLS, Galardo AK, Sallum MAM.** Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in the Brazilian Amazon. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103:791-9.
 45. **Peyton E.** *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami*, resurrected from synonymy with *nuneztovari* and validated as a senior synonym of *Anopheles trinkae* (Diptera: Culicidae). 1993;25:151-6.
 46. **Klein T, Lima J, Tada M.** Comparative Susceptibility of Anopheline Mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;44:598-603.
 47. **Povoa, Marinete, De Souza, Raimundo, Lacerda RN, Rodriguez de Souza J, Wirtz, Robert, Schlichting, Carl, et al.** The importance of

- Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101:163-8.
48. **Conn J, Wilkerson R, Segura M, de Souza R, Schlichting C, Wirtz R, et al.** Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 2002;66:18-22.
 49. **Faran ME.** Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIV. A revision of the *Albimanus* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contribution American Entomology Institut*. 1980;15:1-216.
 50. **Forattini O.** *Entomologia Medica*. Facultad de Higiene e Salud Publica. Departamento de Parasitologia 1962; vol 1;1:662.
 51. **Galvao ALA, Lane J.** Observacoes sobre algunos anofelinos de Salobra, Mato Grosso (Diptera, Culicidae). *Revista Biology and Hygiene* 1110-18. 1941;11:10-18.
 52. **Do Nascimento TFS, Lourenco-de-Oliveira R.** *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97:801-11.
 53. **Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, De Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF.** Anopheline Species Complexes in Brazil. Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93:651-5.
 54. **Gómez G, Bickersmith, Sara, González, Ranulfo, Conn, Jan E, Correa, Margarita.** Molecular Taxonomy Provides New Insights into *Anopheles* Species of the Neotropical Arribalzagia Series. *PLoS One*. 2015;1-17.
 55. **Rosero D, Naranjo-Diaz N, Alvarez N, Cienfuegos A, Torres C, Luckhart, Shirley, et al.** Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) Naturally Infected with *Plasmodium* spp. *ISNR Parasitology*. 2013;927453 <http://dx.doi.org/10.5402/2013/927453>.
 56. **Montoya C, Bascuñan P, Rodriguez-Zabala J, Corre M.** Abundance, composition and natural infection of *Anopheles* mosquitoes from two malaria-endemic regions of Colombia. *Biomedica*. 2017;37:98-105. doi: <https://doi.org/10.7705/>

57. **Manguin, Sylvie, Roberts, Donald, Peyton, E.L, Fernandez-Salas I, Barreto M, Fernandez R, et al.** Biochemical Systematics and Population Genetic Structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, Vector of Malaria in Central and South America. *American Journal Tropical Med Hyg.* 1995;53:362-77.
58. **Estrada-Franco JG, Lanzaro GC, Ma MC, Walker-Abbey A, Romans P, Galvan- Sanchez C, et al.** Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato from three countries of neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1993;49:735-45.
59. **Estrada-Franco JG, Ma MC, Lanzaro GC, Gwadz R, Galván-Sánchez C, Céspedes JL, et al.** Genetic evidence of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato. *Bulletin of the Pan American Health Organization.* 1993. p.26-31.
60. **Gutiérrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, et al.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz.* 2009;104:1117-24.
61. **Ocampo C, Brogdon W, Orrego C, Montoya-Lerma, J.** Insecticide susceptibility in *Anopheles pseudopunctipennis* from Colombia: comparison between bioassays and biochemical assays. *Journal American Mosquito Control Assoc.* 2000;16:331-8.
62. **Faran M, Linthicum K.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematic.* 1981;13;1:1-81.
63. **Navarro J.** Actualización taxonómica de la tribu Anophelini de Venezuela con nueva clave para la identificación de larvas de 4to estadio. *Boletín Malariología y Salud Ambiental.* 1996;36: 25-43.
64. **Gómez GF, Cienfuegos A V., Gutiérrez LA, Correa MM, Conn JE.** Morphological and molecular analyses demonstrate identification problems of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) using dichotomous keys. *Revista Colombiana de Entomología.* 2010;36; 1:68-75.
65. **Calle D a., Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo N.** Discriminación por

- morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biomédica*. 2008;28:371-85.
66. **Hebert P, Cywenska A, Ball S, DeWaard J.** Biological identifications through barcodes. *Proceeding of the Real Society L B*. 2003;270:313-21. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
 67. **Uribe-Gil G, Alcaraz-López G.** El mal de ojo y su relación con el marasmo y kwashiorkor: El caso de las madres de Turbo, Antioquia, Colombia. *Investigación Educación en Enfermería*. 2007;25:72-82.
 68. **World Health Organization (WHO).** Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and techniques. *Manual on practical entomology in malaria Part II Methods and techniques*. 1975;6-191.
 69. **Rueda L.** Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hidrobiología*. 2008;595:477-87. doi: 10.1007/s10750-007-9037-x
 70. **Suárez M, Quiñones M, Robayo M.** Clave para la determinación taxonómica de larvas y adultos hembras de los principales anofelinos de Colombia. Ministerio de Salud de Colombia. 1988; p. 49.
 71. **Scott J, Williams G, Collins F.** Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;49:520-529.
 72. **Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek KR.** DNA primers for amplification of mitochondrial *Cytochrome C Oxidase* subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology*. 1994;3:294-299.
 73. **Ruiz-López F, Linton YM, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Quiñones ML, et al.** Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105:899-903
 74. **Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN.** Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular Biochemical Parasitology*. 1993;58:283-92.

75. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution*. 1980;16:111-20.
76. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular and Biology Evolution*. 1987;4:406-25.
77. **Snounou G, Viriyakbosol S, Zhu Xin P, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario V, et al.** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular Biochemical Parasitology*. 1993;61:315-20.
78. **Ahumada ML, Orjuela LI, Pareja PX, Conde M, Cabarcas DM, Cubillos EFG, et al.** Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria Journal*. 2016;15:407 <http://doi.org/10.1186/s12936-016-1421-4>.
79. **Herrera M, Orjuela L, Peñalver S, Conn JE, Quiñones M.** *Anopheles* species composition explains differences in *Plasmodium* transmission in La Guajira, northern Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;1-5 doi: 10.1590/0074-0276140126.
80. **Hoyos R, Suaza J, Tenorio A, Uribe S, Gallego J.** Molecular detection of Eastern Equine Encephalitis virus in mosquitoes from La Pintada (Antioquia). *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia, Córdoba*. 2015;20:4800-6.
81. **Marteis L, Natal D, Sallum M, Souza A, Oliveira T, Santos R.** Mosquitos da Caatinga e importancia epidemiologica da fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae) de una floresta seca tropical endemica do Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2017.
82. **McKeon S, Schlichting C, Pova M, Conn4 JE.** Ecological Suitability and Spatial Distribution of Five *Anopheles* Species in Amazonian Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;88:1079-86 doi:10.4269/ajtmh.12-0203.
83. **Rubio-Palis Y.** *Anopheles (Nyssorhynchus)* de Venezuela, Taxonomía, Bionomía, Ecología e Importancia Médica. Maracay, Venezuela, 2000. p.

- 138.
84. **Gutiérrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, et al.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*. 2008;107:99-105; doi: 10.1016/j.acta tropica.
 85. **Frederikson EC.** Bionomics and Control of *Anopheles albimanus*. Panamerican Health Organization. 1993;34:76.
 86. **González R, Martínez LM.** Nuevo registro de distribución altitudinal de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera:culicidae). *Boletín del Museo Entomológico Universidad del Valle*. 2006;7:19-23.
 87. **Arevalo-Herrera M, Quiñones M, Guerra C, Céspedes N, Giron S, Ahumada M, et al.** Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America Myriam. *Acta Tropica*. 2012;121:303-14.
 88. **Montoya C, Bascuñan P, Rodríguez-Zabala J, Corre M.** Abundance, composition and natural infection of *Anopheles* mosquitoes from two malaria-endemic regions of Colombia. *Biomédica*. 2017;37:98-105.
 89. **Brochero H, Pareja PX, Ortiz G, Olano VA.** Sitios de cría y actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el municipio de Cimitarra, Santander, Colombia. *Biomédica*. 1 de junio de 2006;26:269- 277.
 90. **Rodríguez M, Chavez B, Orozco A, Martinez-Palomo A.** Fine structure of the eggs of *Anopheles* (*Anopheles apicimacula*, (Diptera: Culicidae). *Journal of American Mosquito Control Association*. 1996;12:454-459.
 91. **Fajardo P, Barreto P.** Anophelinos de Córdoba (Buenaventura, Colombia). *Colombia Medica*. 1983;14:99-103.
 92. **González-Ceron L, Rodríguez M, Nettel J, Villareal C, Kain K, Hernández J.** Differential Susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to Infections with Coindigenous *Plasmodium vivax* Variants VK210 and VK247 in Southern Mexico. *Infection and Immunity*. 1999;410-2.
 93. **Hayes J, Calderón G, Falcon R, Zambrano V.** Newli incriminated Anopheline vector of human malaria Parasites in Junin departament, Perú. *Journal American Mosquitou Control Association*. 1987;3:418-22.
 94. **Lardeux F, Loayza P, Bouchité B, Chavez T.** Host choice and human

- blood index of *Anopheles pseudopunctipennis* in a village of the Andean valleys of Bolivia. *Malaria Journal*. 2007;6:8. doi:10.1186/1475-2875-6-8.
95. **Zapata M, Cienfuegos A, Quirós O, Quiñones M, Luckhart S, Correa M.** Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Uraba, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;77:67-72.
 96. **Tadei W, Thatcher B, Santos J, Scarpassa V, Rodrigues IB, Silva M.** Ecologic Observation on Anopheline, vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59:325-35.
 97. **Mantilla G, Oliveros H, Barnston A.** The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960–2006. *Malaria Journal*. 2009;8.
 98. **Rejmánková J, Grieco J, Achee N, Robert D.** Ecology of larval habitats. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. in Tech. 2013.
 99. **González R.** Efecto del criadero sobre la duración del ciclo de vida y productividad de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). 2005;6:1-6.
 100. **Organización Panamericana de la Salud (OPS).** Biología y Ecología de *Anopheles albimanus*, Wiedeman en Centroamérica. 1996. p. 189-220.
 101. **Hoyos R, Graciano S, Ríos J.** Evaluación del Notonectido como control biológico de larvas de *Aedes Aegypti*. *Revista de Ciencias Ambientales y Sostenibilidad CAS*. 2014;1:4-14.
 102. **Conn JE, Wilkerson R, Segura N, De Souza R, Chlichting C, Wirtz R, et al.** Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in Land use. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;66:18-22.
 103. **Blanco S, Martínez A, Cano R, Tello R.** I Introducción del *Bacillus sphaericus* cepa-2362 (Griselefs) para el control biológico de vectores maláricos en Guatemala. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2000;52:37-43.
 104. **Blanco S, Colombi E, Flores L, Canales D.** Aplicación del biolarvicida

Bacillus sphaericus-2362 para el control de la Malaria en un área de salud de la República de Honduras. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2002;54:134-41.

105. **Ageep T, Cox J, Hassam M, Knols B, Benedict M, Malcolm C.** Spatial and temporal distribution of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in northern Sudan: Influence of environmental factors and implications for vector control. Malaria Journal. 2009;7:123-36.
106. **Gould E, Higgs S.** Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. Transaction Real Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2009;103:103-121.