



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Bionomía y determinación del papel como
vectores de *Anopheles* (Diptera: Culicidae)
en localidades endémicas para malaria de
Guaviare y Vichada, Colombia**

IRENE DEL PILAR JIMENEZ RONCANCIO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2013

Bionomía y determinación del papel como vectores de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) en localidades endémicas para malaria de Guaviare y Vichada, Colombia

IRENE DEL PILAR JIMENEZ RONCANCIO

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director (a):

PhD., HELENA LUISA MARGARITA BROCHERO

Línea de Investigación:

Entomología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2013

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a JAIDIVE RONCANCIO P.

El Amor es el motor que mueve el universo,

El amor es la expresión más sincera y desinteresada;

El amor es el remedio para cualquier dolencia, y la palabra más adecuada para dar ánimo.

El amor es la mejor caricia para aliviar la angustia, y la única sonrisa en tiempos difíciles.

El amor trae consigo la solución a cualquier problema, y es el mejor consejo en medio de la tempestad.

El amor es la máxima expresión de la inocencia

El amor es suave, calentito, dulce, y colorido;

Gracias Mami porque tu infinito amor me ha permitido ser un mejor ser humano

*Quando la luna haya desaparecido del
Firmamento y los casquetes polares hayan
Avanzado hasta el Ecuador, sobre un fragmento
De Liqueen que crezca en las rocas próximas a
Las nieves perpetuas de Panamá, se encontrará
Un insecto moviendo sus antenas en la débil
Luz del gastado sol, que representará la única
Manifestación de vida en la tierra”*

Holland, W.

Agradecimientos

- A la Doctora Helena Brochero de la Facultad de Agronomía- Universidad Nacional de Colombia – Bogotá, por su apoyo, dedicación y enseñanzas.
- A mi familia por su amor incondicional, paciencia y constante ánimo.
- A Nicolás Umaña por su amor ilimitado, paciencia y apoyo.
- A mis amigos y compañeros inseparables Juanita, Tomás, Simona y Rufo por las noches de silencio y muy buena compañía.
- A mi Papá Alberto y a mi abuela Irene por su compañía y amor desde tierras lejanas.
- A la Doctora Jan Evelyn Conn – National Institute of Health, por el soporte académico, y su constante ánimo.
- A mis amigos, compañeros de viaje y maestros Humberto Mosquera Jaramillo, y Juan Sebastián Durán Ahumada.
- A María Camila Ramírez por su amistad, cariño y por el diseño y elaboración de los mapas de las localidades de estudio.
- A la Secretaría Departamental de Salud de San José del Guaviare, Guaviare por el apoyo en el desarrollo del trabajo de campo
- Al ingeniero y entomólogo Laureano Mosquera y al personal técnico del Laboratorio de Salud Pública del municipio de San José del Guaviare, Guaviare por su amistad y el apoyo en el trabajo de campo.
- A la Secretaría Departamental de Salud de Puerto Carreño, Vichada
- Al personal profesional y técnico del Laboratorio de Salud Pública del municipio de Puerto Carreño, Vichada
- Al personal profesional y técnico del Laboratorio de Salud Pública del municipio de Miraflores, Guaviare por el apoyo en el trabajo de campo.
- A la población del Guaviare en especial a Don Vicario y Keiner por sus historias y buena compañía en las largas noches de captura.
- A los miembros del laboratorio de genética de insectos y amigos, Johanna Fernández María Fernanda Álvarez, Jenny García, Diana Ortiz y Diana Suárez.
- A la Doctora Martha Lucía Quiñones Facultad de Medicina – Universidad Nacional de Colombia- Bogotá por el apoyo en el procesamiento de las muestras para ELISA.
- Al Doctor Ranulfo González - Universidad del Valle por el apoyo académico incondicional.
- A Martha Liliana Ahumada del Instituto Nacional de Salud
- A todo el Personal del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá.
- A la Universidad Nacional de Colombia - QuiPu 201010012197.
- Al Proyecto Malaria Vectors Biology in Brazil/Colombia: Genetics & Ecology - USA NIH AI 2R01AIO54139.

Resumen

Colombia es el segundo país de mayor incidencia de malaria en Sur América siendo *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* las especies parasitarias responsables del 80% de los casos. La dinámica de transmisión es complicada debido a vectores pertenecientes a complejos de especies, al uso del suelo en agricultura y minería; a la resistencia a medicamentos e insecticidas y problemas sociales como el desplazamiento forzado no planificado de humanos a centros urbanos que genera poblaciones humanas flotantes portadoras y susceptibles. Debido a la ausencia de una vacuna eficaz para humanos, la prevención y control de la malaria está enfocado hacia el diagnóstico adecuado y tratamiento oportuno de las personas contagiadas y hacia el control de los insectos vectores. Debido a las condiciones geográficas, climáticas y sociales propios del país, existen varios escenarios que tipifican la transmisión de la malaria. Estos escenarios inciden de forma determinante en la modificación de aspectos de la biología de los vectores de malaria. Se requiere entonces caracterizar los anofelinos presentes en cada área, definiendo su estatus taxonómico mediante caracteres morfológicos y moleculares que permitan establecer asociaciones con aspectos de su biología (comportamiento de picadura, preferencia alimentaria, sitios de cría, infección por *Plasmodia*,) y por tanto, con aspectos de la epidemiología de la enfermedad en la zona objeto de estudio, para determinar estrategias de prevención y control. En este contexto, se realizó un estudio de tipo longitudinal en tres localidades endémicas para malaria determinando la riqueza y abundancia de los insectos vectores evaluando características biológicas tales como: comportamiento de picadura a humanos, sitios de cría, y su infección natural por parásitos del género *Plasmodium* y tasa de inoculación entomológica. Para ello, se realizaron capturas de adultos silvestres, se determinaron taxonómicamente las formas inmaduras y adultas a partir de caracteres morfológicos y moleculares; se caracterizaron los sitios de cría y se determinó su infección natural usando la técnica colorimétrica de ELISA. Se registran los vectores de malaria y aspectos de su biología para el municipio de Puerto Carreño, Vichada y San José del Guaviare y Miraflores en Guaviare. Con base en los resultados se sugieren estrategias de control. El documento está estructurado en capítulos donde se encuentran los resultados para formas inmaduras y adultos en cada localidad. Este trabajo se realizó en el marco del proyecto "Malaria Vectors Biology in Brazil: Ecology & Genetics" y fue financiado por el National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos de América, por las Secretarías de Salud Departamental de Vichada y Guaviare; y por la Universidad Nacional de Colombia.

Palabras Clave: *Anopheles*, Malaria, Orinoquia, Amazonia, vectores de enfermedades, sitios de cría

”.

Abstract

Colombia is the second country with the highest incidence of malaria in South America. Parasitic species responsible for 80% of cases are *P. falciparum* and *P. vivax*. The transmission dynamics is complicated by vectors belonging to species complexes, resistance to drugs and insecticides, and social problems such as unplanned human forced displacement to urban centers, generating carriers and floating human populations susceptible

Due to the absence of an effective human vaccine, prevention and control of malaria is focused on the proper diagnosis and treatment of infected people and to control insect vectors. Due to geographical, climatic and social characteristic of the country, there are several scenarios that typify the transmission of malaria. These scenarios have a decisive influence in modifying aspects of malaria vectors biology, such as biting behavior patterns, seasonality and food preference. Then, is important to characterize and to define locally anopheline taxonomic status by morphological and molecular characters to establish partnerships with aspects of their biology (biting behavior, food preference, breeding sites, *Plasmodium* infection,) and therefore, with aspects of the epidemiology of the disease in the study area to determine prevention and control strategies.

In this context, a longitudinal study was undertaken in three endemic areas for malaria determining the richness and abundance of insect vectors evaluating biological characteristics such as human biting behavior, breeding sites, and natural infection by parasites of the genus *Plasmodium* and entomological inoculation rate.. Wild adults were captured, Immature and adults forms were determined by morphological and molecular characters, breeding sites were characterized and their natural infection was determined using the colorimetric ELISA. Malaria vectors and aspects of their biology for the municipality of Puerto Carreño, Vichada and Guaviare and San José del Guaviare Miraflores recorded. Based on the results of control strategies are suggested. The document is divided into chapters where the results for immature forms and adults are found in every town. This work was performed under the "Malaria Vectors in Brazil Biology: Ecology & Genetics" project was funded by the National Institute of Health (NIH) in the United States of America, by the Ministries of Health Department of Vichada and Guaviare; and the National University of Colombia

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XIV
Introducción	1
MARCO TEÓRICO	3
La Malaria	3
La malaria en Colombia.....	3
Malaria y procesos de uso del suelo.....	6
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	7
CUERPO DE HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	8
GENERAL.....	8
ESPECÍFICOS	8
1. Vichada	9
1.1 <i>Anopheles</i> (Díptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia	9
1.2 Sitios de Cría de <i>Anopheles</i> (Diptera: Culicidae) en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia	22
2. Capítulo	33
2.1 Malaria Vectors in San José del Guaviare, Orinoquia, Colombia	33
2.2 <i>Anopheles</i> breeding sites in San José del Guaviare Amazonia- Colombia.....	46
2.3 Anopheline malaria vectors in Miraflores, Guaviare Department, Amazonian Colombia.....	56
3. DISCUSIÓN GENERAL	67
4. Conclusiones y recomendaciones	71
4.1 Conclusiones	71
4.2 Recomendaciones	72
Bibliografía	73

Lista de figuras

CAPITULO 1

ARTICULO 1-1: *Anopheles* (Díptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Figura 1 Ubicación de Puerto Carreño, Vichada Colombia (SIGAP 2009).....	11
Figura 2 Sitios de captura de mosquitos adultos silvestres en Puerto Carreño, Vichada, Colombia 2009.....	12
Figura 3 Tasa promedio de picadura por hora por hombre de <i>Anopheles darlingi</i> y <i>An. marajoara</i> s.s en el área urbana de Puerto Carreño, Vichada 2009.....	17

ARTICULO 1-2: Sitios de Cría de *Anopheles* (Díptera: Culicidae) en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Figura. 1 Ubicación geográfica de Puerto Carreño, Vichada, Colombia	24
Figura. 2 Sitios de Cría de <i>Anopheles</i> spp., en Puerto Carreño, Vichada 2009.....	27
Figura. 3 Sitios de Cría de <i>Anopheles</i> spp., en época de lluvia en Puerto Carreño, Vichada 2009.....	28

CAPITULO 2

ARTICULO 2-1: Malaria vectors in San José del Guaviare, Colombia

Figure 1 Map of Colombia with the Department of Guaviare enlarged showing the municipalities	35
Figure 2 Variation in percentage contribution of <i>An. darlingi</i> biting activity for three periods of the night	39
Figure 3 Variation in percentage contribution of <i>An. albitarsis</i> s.l biting activity for three periods of the night	40

ARTICULO 2-2: *Anopheles* breeding sites in San José del Guaviare – Amazonia- Colombia

Figure. 1 Map of Colombia with the Department of Guaviare enlarged showing the municipalities.....	47
Figure. 2 Map of breeding sites sampling in urban and periurban area in San José del Guaviare, Colombia 2010.....	50
Figure. 3 Correspondence Analyses factor map <i>Anopheles</i> spp Vs breeding sites types *temporal breeding site type; Abandoned FP=Abandoned fish ponds, *permanent breeding sites; Fish ponds, stream, flooded Quarry, Wet lands	51

ARTICULO 2-3: Anopheline malaria vectors in Miraflores, Guaviare Department, Amazonian Colombia

Figure, 1 Map of Colombia depicting location of four municipalities in Guaviare Department	57
Figure, 2 Breeding site and wild female collection locations in periurban Miraflores, Guaviare, Colombia, 2010.....	59
Figure, 3 Percentage of mosquitoes (y-axis) collected per hour, between 18:00 h and 6:00 h (x-axis) by collection (indoor, outdoor) and season in Miraflores, Colombia. March – dry season; September – rainy season	61

Lista de tablas

CAPITULO 1

ARTICULO 1: *Anopheles* (Díptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Tabla 1 Abundancia relativa, actividad de picadura, e infección natural por parásitos del género Plasmodium que afectan a humanos en las especies de *Anopheles* spp., del municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia 2009 15

ARTICULO 2: Sitios de Cría de *Anopheles* (Díptera: Culicidae) en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Tabla. 1 Presencia de las especies de *Anopheles* en 21 criaderos indicando preferencias por tipo de habitación (N= número de criaderos revisados para cada tipo; n= número de series obtenidas por especie)26

CAPITULO 2

ARTICULO 2-1: Malaria vectors in San José del Guaviare, Colombia

Table 1 *Anopheles* species composition in two localities of San José del Guaviare-Amazonia, Colombia, 2010.37

ARTICULO 2-2: *Anopheles* breeding sites in San José del Guaviare – Amazonia- Colombia

Table. 1 Frequency of anopheline per type and per locality in San José del Guaviare municipality, Amazonia, Colombia 2010..... 49

ARTICULO 2-3: Anopheline malaria vectors in Miraflores, Guaviare Department, Amazonian Colombia

Table, 1 Indoor, Outdoor human biting rate (HBR) of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) during three periods of the night in Miraflores, Guaviare, Colombia, 2010. 60

Table, 2 Seasonal *Anopheles* immature forms collected from breeding site types in Miraflores, Guaviare, Colombia, 2010 62

Introducción

La malaria es una enfermedad transmitida mediante la picadura de hembras de los mosquitos del género *Anopheles* y producida por parásitos del género *Plasmodium*. Los agentes causales de malaria en humanos son *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, siendo el primero, el más infeccioso y el más letal (Chwatt 1980). En las Américas, la relación de los dos primeros parásitos corresponde a una proporción 1:2. Sin embargo, debido a la resistencia a medicamentos registrada para *P. falciparum*, dicha relación se aproxima a 1:1 situación que agrava más la malaria debido a que *P. falciparum* es responsable de la malaria grave provocando mortalidad (Cortes *et al.*, 2002; Orjuela *et al.*, 2004).

En Colombia el 85% del territorio situado por debajo de los 1600 msnm presenta condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de malaria, donde 18 a 24 millones de personas se encuentran en grave riesgo de enfermar, o incluso morir por esta enfermedad (Mendoza *et al.*, 2000). El país registra más de 45 especies de anofelinos de los cuales con base en evidencia epidemiológica y el aislamiento de parásitos del género *Plasmodium* se consideran como vectores principales a *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root 1926, *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldon 1940 y *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann 1820 (Montoya-Lerma *et al.*, 2011; Olano *et al.*, 2001, Herrera *et al.*, 1987; Servicio de Erradicación de la Malaria –SEM, 1957). Sin embargo, en varios estudios se ha propuesto que otras especies pueden estar actuando como vectores locales o regionales manteniendo las endemias de malaria al coexistir con vectores de amplia distribución y reconocido papel transmisor (Lounibos & Conn 2000).

Durante el 2010, año en que se realizó este trabajo, el SIVIGILA registró en Colombia un total de 115.884 casos de malaria, de los cuales 81.947 (70,71%) correspondieron a malaria por *P. vivax*; 32.446 (28%) a *P. falciparum*; y 1.434 (1,24%) a malaria asociada (*P. vivax* y *P. falciparum*); con un diagnóstico de 42 muertes. Un año después (2011) se notificaron un total de 62.716: 46.188 (73,7%) por *P. vivax*, 14 15.662 (25,0%) por *P. falciparum* y 3.841 (1,3%) por malaria mixta, con un registro de 1540 casos de malaria complicada y 18 muertes. Aunque en los años siguientes hubo una disminución en los casos de malaria se estima que existe un subregistro en la notificación por lo menos de 3:1, resultado del conflicto armado, descentralización del sistema nacional de salud que genera falencias en los procesos de análisis de casos y de notificación, anuado al alto nivel de pacientes asintomáticos que se registran en aéreas endémicas (Padilla *et al.*, 2011)

La carencia de una vacuna para esta enfermedad, resistencia de los parásitos a los medicamentos y problemas sociales como el desplazamiento forzado no planificado de humanos a centros urbanos, y el uso de suelo para sistemas agrícolas y minería que generan criaderos permanentes para los insectos vectores, determinan a esta enfermedad como un grave problema de salud pública (INS 2009). Debido a las

condiciones geográficas, climáticas y sociales propios del país, existen varios escenarios que tipifican la transmisión de la malaria, encontrándose transmisión estable, ocasional, estacionaria, rural, periurbana e incluso, urbana (WHO 1975). Además, se ha observado una fuerte asociación entre la ocurrencia del Evento del Niño (ENSO) y el incremento en la transmisión de la enfermedad (Poveda & Rojas 1997; Bouma *et al.* 1997), lo que aunado la presión antrópica en los ecosistemas debido al uso intensivo del suelo complejizan la malaria.

Estos escenarios influyen de forma directa en la modificación de aspectos de la biología de los vectores de malaria, como por ejemplo en sus patrones de comportamiento de picadura, estacionalidad y preferencia alimentaria (Mirabello *et al.*, 2008). En efecto, estudios sugieren procesos de especiación reciente en mosquitos *Anopheles* encontrándose especies crípticas que constituyen complejos de especies. Los miembros de estos complejos como el caso del complejo *Anopheles Albitarsis* con al menos 6 especies, se caracterizan porque morfológicamente son indistinguibles (Rosa-Freita & Deane 1989; Lehr *et al.* 2005) pero presentan características ecológicas, y biológicas disímiles que han sido asociadas con cambios a nivel de su genoma y dificultan la adecuada determinación taxonómica (Brochero, *et al.*, 2007; Conn *et al.* 2002; Ruiz *et al.*, 2012). Las hembras del Complejo pueden ser diferenciadas por técnicas moleculares como PCR utilizando cebadores especie-específicos de ADN mitocondrial (COI) (Ruiz *et al.*, 2012). Son consideradas vectores de malaria a humanos en Sur América (Conn *et al.* 2002, Tadei & Dutary-Thatcher 2002, Motoki *et al.* 2009) y como plaga tienen efectos directos en los costos de producción en sistemas agrícolas debido a la resistencia a insecticidas, la molestia de sus picaduras, incapacidad, enfermedad y muerte de la fuerza de trabajo que sostiene los sistemas productivos (Wallner 1987; Gallup 1998; Weiss & McMichael 2004).

En los últimos años se ha señalado la importancia de realizar estudios regionales acerca de las poblaciones de *Anopheles*, los cuales permitirían la confirmación taxonómica de las especies de este género (Lounibos y Conn, 2000), dado que en las áreas de transmisión pueden presentarse especies que hacen parte de complejos, los cuales incluyen vectores y no vectores de malaria que en ocasiones pueden estar en simpatria (Collins y Paskewitz, 1996; Kreutzer *et al.*, 1976; Wilkerson *et al.*, 1995^a, 1995^b; Rosa-Freitas *et al.*, 1998; Marrelli *et al.*, 2005). El estudio de la biología y ecología de las especies, sumado a una adecuada confirmación taxonómica y a la detección de infección natural con *Plasmodium* contribuye al entendimiento de la dinámica de transmisión, conocimiento que es indispensable para la selección de las medidas de control vectorial selectivo en cada área (Zimmerman, 1992; Grieco *et al.*, 2005).

MARCO TEÓRICO

La Malaria

La malaria es una infección causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, que se transmiten al hombre a través de la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*. Según un informe mundial sobre malaria, 3.200 millones de personas se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad (PAHO 2005) (Figura 1). La mayoría de casos son causados por *P. vivax* y *P. falciparum*, siendo este último el responsable de más de un millón de fallecimientos directos (PAHO 2005). Las características de la transmisión son diferentes entre regiones. Esto se debe a la variación de los parásitos, los mosquitos vectores, las condiciones ecológicas y factores socio - económicos como la pobreza y el acceso oportuno a servicios de atención de salud y prevención. En el continente Americano, se calcula que aproximadamente el 57% de la población (293'000.000 personas) vive en 21 países con características económicas y ecológicas particulares que favorecen la transmisión de la malaria, reflejados en un indicador conocido como "índice parasitario anual" (IPA), el cual relaciona el número de casos por 1.000 habitantes de una zona geográfica específica (PAHO 2005).

En las Américas, la transmisión de malaria ha sufrido un incremento debido a los desplazamientos de población asociados a la violencia, explotación maderera y de minas de oro que han provocado epidemias aisladas. Todos los países afectados recurren al rociamiento intradomiciliar de insecticidas de acción residual, a la aplicación de larvicidas en zonas de riesgo focalizadas y la distribución de toldillos impregnados insecticidas como principales estrategias de control hacia los insectos vectores (PAHO 2005).

La malaria en Colombia

En Colombia, la malaria se encuentra como prioridad en las metas del milenio del país debido a que constituye un grave problema de salud pública. El 85% del territorio reúne las condiciones ecológicas para su transmisión y el 65% de la población se encuentra en riesgo de enfermar o morir por esta enfermedad (Mendoza *et al.*, 2000). La malaria provoca enfermedad, incapacidad y muerte, generando un 30% de costos directos al programa de Prevención, vigilancia y control que son asumidos en gran parte por el Estado, pero también ocasionando costos asumidos por las familias afectadas que han sido estimados en un 70%. De esta manera, la morbilidad y mortalidad generada por la malaria tiene un importante impacto económico y social derivado de la atención de la enfermedad y de la pérdida de capacidad de producción. Este último aspecto es muy importante para el país, debido a que la mayor parte de la población afectada está determinando la fuerza laboral (con casos reportados para edades entre los 15 y 45 años), especialmente en poblaciones pobres que habitan en zonas rurales (Ministerio de Protección Social 2006).

Para la vigilancia en salud pública de la malaria en Colombia se consideran 6 regiones eco-epidemiológicas definidas teniendo en cuenta parámetros de altitud, tipo de vegetación, temperatura, humedad relativa y nivel de pluviosidad. En estas regiones, se puede analizar el comportamiento de la malaria con respecto a aspectos culturales, sociales, demográficos, económicos, ambientales y entomológicos. Las zonas de más

riesgo de transmisión son la Costa Pacífica, la región del Uraba, la zona del Bajo Rio Cauca el Alto Rio Sinú, así como los territorios de la Orinoquia y Amazonia Colombiana (Padilla *et al.*, 2011). Estas poblaciones clásicamente han sido habitadas por población afrocolombiana e indígena, actualmente con procesos de colonización intensiva y actividades extractivas.

Existen varios factores de riesgo que hacen más complejo y dinámico el comportamiento de la malaria, como son: a) cambios en la susceptibilidad del hospedero debido al grado de experiencia malárica (pacientes asintomáticos); b) La resistencia de los parásitos a los medicamentos, c) Los relacionados con vectores, tales como la correcta determinación taxonómica de complejos de especies del genero *Anopheles*, cambios en el comportamiento de picadura, sitios de reposo y de cría, la incriminación vectorial, el desarrollo de resistencia a los insecticidas y las variaciones en los nichos ecológicos causados por fenómenos climáticos; d) Procesos de colonización no planificados y desarrollo de proyectos económicos agresivos como la explotación minera y forestal no planificada, e) Situaciones sociales específicas derivadas de los cultivos ilícitos, del conflicto armado y la pobreza en el campo, que desencadenan migraciones desordenadas y poblaciones desplazadas por la violencia, estos últimos, de especial trascendencia en el último quinquenio, Y f) Cambios en el sistema de salud colombiano a partir de la implementación de la descentralización del sistema nacional de vigilancia de acuerdo con la Ley 100 (Instituto Nacional de Salud 2000). En términos generales, se considera que 22 departamentos presentan transmisión permanente de malaria y que aproximadamente 500 municipios evidencian transmisión de la enfermedad (Padilla *et al.*, 2011).

Para el control de la malaria, Colombia acogió la iniciativa de propuesta de la Organización Mundial de la Salud “Hacer Retroceder el Paludismo”, la cual se fundamenta en tres componentes: 1) diagnóstico inmediato/tratamiento oportuno; 2) control selectivo de vectores y 3) fortalecimiento de la vigilancia en salud pública a nivel local (PAHO 2000). El país determinó que son necesarios la gestión eficaz en el sistema de salud, un diagnóstico rápido y tratamiento adecuado, prevención múltiple, investigación operativa y coordinación intra e intersectorial.

Basados en la Ley 715 de 2001, la vigilancia en salud pública de malaria en Colombia, se desarrolla delegando a los departamentos y municipios las responsabilidades para el diseño, desarrollo y evaluación de los programas para la vigilancia, prevención y control acorde con las características epidemiológicas y socioculturales de la región y con el apoyo del Ministerio de salud y de Protección Social como el ente normativo y del Instituto Nacional de Salud como Laboratorio Nacional de Referencia. Cada entidad territorial debe desarrollar los procesos de planeación, ejecución y seguimiento de las acciones de control de vectores con base en la formulación de los Planes de Atención Básica (PAB) y el diseño de planes municipales de control. Las acciones de atención individualizada (diagnóstico y tratamiento) están contempladas en el Plan Obligatorio de Salud (POS) para la población afiliada y en los recursos de la oferta para la población vinculada en el marco del sistema de salud del país. La nación transfiere anualmente dineros para el financiamiento de recurso humano, la realización de actividades de campo y la inversión de aspectos operativos, y suministra a las Secretarías de Salud insumos como equipos, insecticidas y medicamentos para garantizar el tratamiento gratuito de la malaria y las medidas de control regulares a nivel nacional.

Vectores de malaria en Colombia

Aparecen registradas para el país aproximadamente 45 especies de mosquitos del género *Anopheles*. Los vectores principales pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus* y son: *An. darlingi* Root 1926, *An. albimanus* Wiedemann 1820 y *An. nuneztovari* Gabaldon 1940. Como vectores auxiliares, regionales o secundarios se consideran a *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* Zavortink 1973, *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar and Knab 1912, *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald 1901 y *Anopheles (Anopheles) punctimacula* Dyar and Knab 1906, estos dos últimos considerados como complejos de especies (Olano *et al.*, 2002, SEM 1957). Además, el SEM registro como vectores a *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* Galvao & Damasceno 1942 (como *Anopheles albitarsis* Lynch Arribalzaga 1878) y *Anopheles (Anopheles) neomaculipalpus* Curry 1931, debido a que se encontraron infectados con parásitos *Plasmodium* humano (SEM 1957). Recientemente se incorporó a *Anopheles rangeli* [Gabaldon, Cova Garcia & Lopez, 1940](#) y *An. oswaldoi* si como vectores secundarios de malaria (Montoya-Lerma *et al.*, 2011)

El subgénero *Nyssorhynchus* contiene los principales vectores de malaria del Neotropico. Este ha sido subdividido en dos secciones: Sección *Argyritarsis* y Sección *Albimanus*, las cuales son diferenciadas por la presencia/ausencia de un anillo oscuro basal en el quinto tarsomero posterior en estadio adulto del mosquito (Faran 1980; Linthicum 1988). Los caracteres morfológicos están muy conservados, lo que dificulta determinar el estatus taxonómico de las especies. En muchos casos, únicamente el porcentaje de manchas oscuras en el tarsomero 2, la localización y tamaño de algunas setas larvales son utilizadas como caracteres diagnósticos. Sin embargo, el solapamiento de estos dificulta la correcta determinación taxonómica de las especies, particularmente porque se encuentra gran variación intraespecífica en los caracteres morfológicos diagnósticos utilizados.. Las especies de este subgénero presentan habilidades relativas para transmitir malaria y se solapan geográficamente especies vectores y no vectores (Faran 1980, Faran & Linthicum 1981, Linthicum 1988).

En anofelinos, el 55% de las especies están agrupadas en complejos de especies (Besansky & Collins 1992). Debido a que el subgenero *Nyssorhynchus* registra complejos de especies crípticas y hermanas se ha sugerido una naturaleza politípica de la morfología de varias especies y el estatus de muchos taxones permanecen sin resolver porque los límites de especie no han sido rigurosamente evaluados para determinar si taxa putativos son unidades evolutivas independientes (Rosa-Freitas *et al.*, 1990, Wilkerson *et al.*, 1995). Se considera que los complejos de especie presentan diferente capacidad vectorial, varían en la naturaleza de flujo génico y variación genética, los cuales son críticos para entender la epidemiología de la enfermedad y definir estrategias de control efectivas (Coluzzi 1979, Tabachnick & Black 1995).

Control Vectorial

Para la toma de decisiones sobre cual medida de control utilizar, es necesario reconocer las especies del género *Anopheles* que están actuando como vectores en cada localidad y asociar aspectos de hábitos de picadura, de reposo y sitios de cría con el propósito de definir estrategias de control integrado y selectivo de vectores Históricamente en el control vectorial se han utilizado insecticidas organofosforados y piretroides dirigidos hacia las hembras adultas, ya sea a través de aplicación por fumigación o incorporados

a telas protectoras (WHO, 1975), en tanto que para sus formas inmaduras se usan productos biológicos como el *Bacillus sphaericus*. Estas estrategias deben ir acompañadas de programas continuados de participación intersectorial, educación y participación comunitaria como la utilización de anjeos, relleno, drenaje y desbroce de la vegetación de criaderos, notificación de eventos febriles, etc., que permitan el desarrollo de actividades de control selectivas e integradas (Ministerio de Salud, 1996).

Malaria y procesos de uso del suelo

En términos del uso del suelo y la dinámica poblacional de las especies consideradas como plagas (vectores), varios estudios han demostrado que algunas de las razones fundamentales para el surgimiento y/o epidemias de plagas y patógenos son los cambios en la ecología y ambiente de las especies huésped, cambios en su dispersión y comportamiento, cambios en el fenotipo de hospedero y finalmente cambios en la genética de los vectores (Woolhouse *et al.* 2005). Los usos del suelo como deforestación, destrucción de hábitat y expansión de la frontera agrícola permiten el aumento del rango de dispersión de las especies hacia nuevos hábitats, oportunismo para el uso de recursos en un ecosistema transformado como son las áreas de extracción minera, agrosistemas, selvas tropicales, y sabanas (Weiss & McMichael 2004, Brochero *et al.* 2007) como también alterando las relaciones tróficas de cada nicho. De forma particular, las estrategias de control de plagas en sistemas agrícolas inciden en el desarrollo de resistencia fisiológica a insecticidas de insectos no blanco (Yadouleton *et al.* 2010). Estos aspectos afectan la capacidad productiva de los campesinos como también la relación económica de los sistemas agrícolas como sustento (Guerra *et al.* 2006, Vittor *et al.* 2006, Yasuoka & Levins 2007). La dinámica ecológica de este grupo de especies incide en varios componentes en los sistemas agrícolas: 1) Aumento en el costo de producción resultado de la modificación en los tiempo de manejo del cultivo que se relacionan con los de mayor actividades de estos insectos, o por incapacidad derivada de la enfermedad de quienes laboran directamente en estos sistemas; 2) Resistencia fisiológica a insecticidas en plagas que afecten los insectos de interés económico en el sistema agrícola, así como de los insectos que afectan al hombre; 3) Competencia interespecífica por uso del recurso y reproducción de las especies insectiles del ecosistema (Merritt *et al.* 1992)

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Podría el conocimiento de aspectos de la biología de las especies de *Anopheles* presentes en los sitios de estudio explicar su importancia como vectores de malaria y permitir una adecuada orientación de las estrategias de prevención, vigilancia y control de la enfermedad a nivel local?
2. Aunque se reconocen insectos vectores a nivel general (de país, de región), ¿para una misma especie es posible encontrar diferencias en aspectos de su biología locales (patrones de comportamiento de picadura, susceptibilidad a infección natural por parásitos del género *Plasmodium* que afecta a humanos; tasa de inoculación entomológica, sitios de cría)?

CUERPO DE HIPÓTESIS

1. Aunque las áreas de estudio presentan características ambientales distintas (temperatura, humedad, clima) y hay diferentes especies de anofelinos coexistiendo en áreas endémicas, *An. darlingi* se ha adaptado rápidamente a ambientes periurbanos altamente modificados por actividades económicas humanas como agricultura, ganadería y minería siendo el vector primario para malaria en la Orinoquia y Amazonia, donde se desarrolla este estudio.
2. Las diferentes características ambientales, ecológicas y sociales de cada área de estudio, aunado a los grados de intervención y procesos de uso del suelo determinan el rol como vectores de malaria de otras especies de anofelinos constituyendo vectores secundarios o regionales que permiten mantener la endemia para malaria durante todo el año, particularmente cuando las densidades del vector primario disminuyen.
3. Se encontrarán algunas especies de *Anopheles* con características de su biología que permitan su incriminación como vectores de malaria, en tanto que otras especies no serán de importancia epidemiológica en las zonas de estudio.
4. Las características ecológicas y ambientales de cada área de estudio determinarán diferencias en la composición de especies de anofelinos y su papel como vectores de malaria.
5. Se encontrarán especies de *Anopheles* de importancia epidemiológica pertenecientes a complejos de especies con características biológicas diferentes.
6. Existen sitios de cría disponibles y aptos para los anofelinos en época de lluvia y de sequía en cada localidad de estudio

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar aspectos de la biología de las especies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) y su papel como vectores de malaria en una localidad endémica de los departamentos de Guaviare Vichada - Colombia.

ESPECÍFICOS

1. Determinar la taxonomía de los mosquitos silvestres recolectados en las áreas de estudio.
2. Determinar el comportamiento de picadura a humanos de los mosquitos *Anopheles* spp., en las áreas de estudio.
3. Caracterizar los sitios de cría de los mosquitos *Anopheles* spp., de las áreas de estudio.
4. Determinar la infección natural por parásitos del género *Plasmodium* en los mosquitos *Anopheles* spp., recolectados en la áreas de estudio.

1. Vichada

1.1 *Anopheles* (Díptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Pilar Jiménez¹, Jan E. Conn^{2,3}, Robert Wirtz⁴, Helena Brochero¹

¹ Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Griffin Laboratory, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Slingerlands, NY, USA

³ Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State University of New York, Albany, NY, USA

⁴ Centers for Disease Control and Prevention, Entomology Branch, Atlanta, Georgia, USA

Publicado en Revista Biomédica como artículo original. Biomédica 2012;12;32(supl):13-21

Resumen: Introducción. El estudio de los aspectos de la biología de los mosquitos *Anopheles* spp. fortalece la vigilancia entomológica. **Objetivo.** Determinar los aspectos de la biología y el comportamiento de las especies adultas del género *Anopheles* presentes en el área urbana de Puerto Carreño. **Materiales y métodos.** Se capturaron *Anopheles* spp. silvestres que se habían posado en personas, en el intradomicilio y peridomicilio de viviendas ubicadas en el área urbana del municipio de Puerto Carreño (Vichada), entre las 18:00 y las 06:00 horas, durante dos noches consecutivas por mes y durante ocho meses. Se determinó la actividad de picadura para cada especie, la infección natural por *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* VK247 y VK210 mediante la técnica ELISA, y se determinó la tasa de inoculación entomológica. Los individuos pertenecientes al complejo Albitarsis se determinaron mediante amplificación en cadena de la polimerasa del fragmento del gen *white*. **Resultados.** En orden de abundancia, se encontraron: *An. darlingi* (n=1.166), *An. marajoara sensu stricto* (n=152), *An. braziliensis* (n=59), *An. albitarsis F* (n=25), *An. albitarsis sensu lato* (n=16), *An. argyritarsis* (n=3) y *An. oswaldoi sensu lato* (n=2). *Anopheles darlingi* registró dos picos de actividad de picadura entre las 21:00-22:00 y las 5:00-06:00 horas en el peridomicilio y, entre las 21:00-22:00 y las 04:00-05:00 horas, en el intradomicilio. Esta especie se encontró naturalmente infectada por *P. vivax* VK210 y registró una tasa de inoculación entomológica de dos para el año. *Anopheles marajoara s.s.* se encontró naturalmente infectado por *P. falciparum* y registró una tasa de inoculación entomológica de 5 para el año, con un máximo de actividad de picadura entre las 18:00 y las 19:00 horas, tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio. **Conclusión.** Es posible que exista transmisión de malaria en el área urbana de Puerto Carreño (Vichada) y *An. darlingi* y *An. marajoara s.s.* serían las especies incriminadas.

Palabras clave: *Anopheles*, malaria, biología, vectores de enfermedades, Colombia

ABSTRACT:***Anopheles* (Diptera: Culicidae) vectors of malaria in Puerto Carreño municipality, Vichada, Colombia**

Introduction. The study of the biological aspects of *Anopheles* spp., strengthens the entomological surveillance. **Objective.** To determine biological aspects and behavior of adult *Anopheles* mosquitoes in the urban area of Puerto Carreño municipality, Vichada, Colombia. **Materials and methods.** Wild anophelines were collected landing on humans both indoors and outdoors between 18:00h and 06:00h for 50 min/h during two consecutive nights/month for eight months in the urban area of Puerto Carreño. The biting rate activity, the natural infection by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* VK247 and VK210 using ELISA, and the annual entomological inoculation rate were determined for each species. The members of the Albitarsis complex were determined by amplification of the white gene by polymerase chain reaction

Keywords: *Anopheles*, malaria, biology, disease vectors, Colombia

INTRODUCTION

Puerto Carreño se encuentra ubicado entre los 6° 11' 16" latitud norte y los 62° 28' 23" longitud oeste. Es una zona de sabana en la Orinoquia colombiana donde confluyen el río Meta y el río Orinoco en la franja fronteriza con la República Bolivariana de Venezuela. La extensión territorial es de 12.409 km² y está representada por un área urbana con el 76,9 % de la población total del municipio y un área rural con el 23,1 % (1). Registra una altitud de 51 msnm, una temperatura media anual de 28,5 °C, una precipitación media anual de 2.059 mm, un régimen monomodal de lluvias que va de abril a noviembre y un periodo seco desde diciembre a marzo (2) (figura 1).

Las principales actividades económicas están enfocadas en la ganadería, la agricultura, la minería y el comercio, lo que aunado al conflicto armado que registra el departamento, determina una población humana flotante con permanente flujo hacia el área urbana.

En 2009, Puerto Carreño tuvo una incidencia anual parasitaria de 8,4 por 1.000 habitantes y prevalencias de 6,1 para *Plasmodium vivax*, de 1,5 para *P. falciparum* y de 0,5 para malaria (3). Según la información epidemiológica de la Secretaría de Salud Departamental, el 39 % de los casos del municipio proviene del área urbana.

Con el propósito de fortalecer la vigilancia entomológica que permita orientar estrategias de control integrado y selectivo de vectores, se estudiaron varios aspectos de la biología de mosquitos adultos *Anopheles* spp., en el área urbana de Puerto Carreño (Vichada).

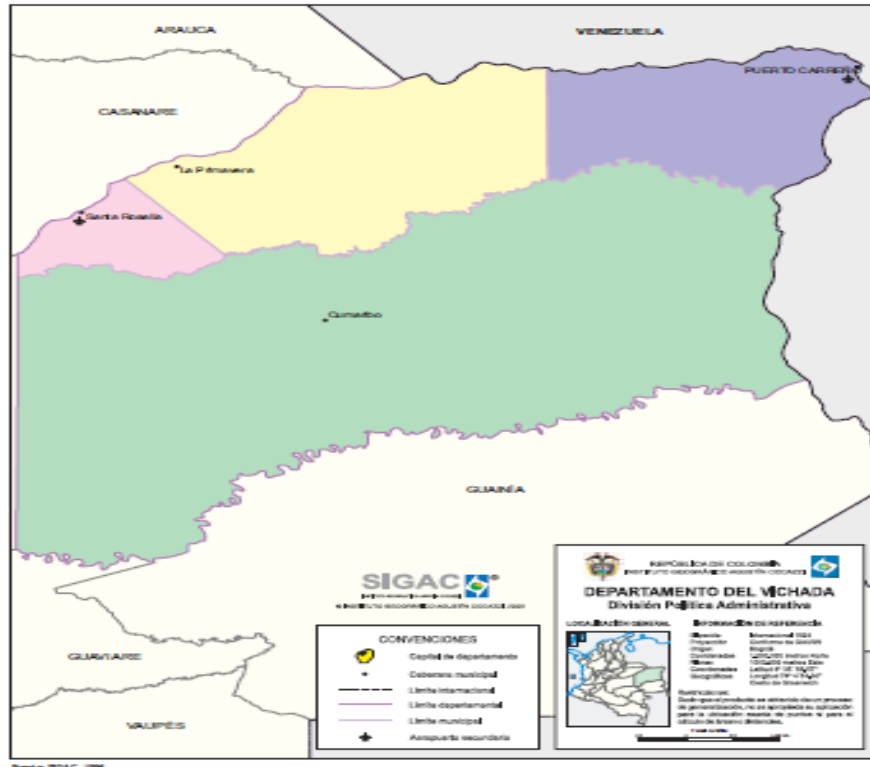


Figura 1 Ubicación de Puerto Carreño, Vichada Colombia (SIGAP 2009)

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se realizó en seis barrios del área urbana de Puerto Carreño: La Primavera, 6° 10' 59,4" latitud norte y 67° 29' 37,5" longitud oeste; La Florida, 6° 11' 31,7" latitud norte y 67° 29' 35,7" longitud oeste; Gaitán, 6° 11' 9,8" latitud norte y 67° 28' 51" longitud oeste; La Esperanza, 6° 12' 2,9" latitud norte y 67° 29' 5,7" longitud oeste; Simón Bolívar, N 6° 11' 55" latitud norte y 67° 29' 1" longitud oeste, y Gabriel Robledo, 6° 11' 37,92" latitud norte y 67° 29' 26,11" longitud oeste. Las casas en las que se llevaron a cabo las capturas de mosquitos se seleccionaron de acuerdo con el registro de casos de malaria según la información de la Secretaría de Salud Departamental del Vichada (figura 2).

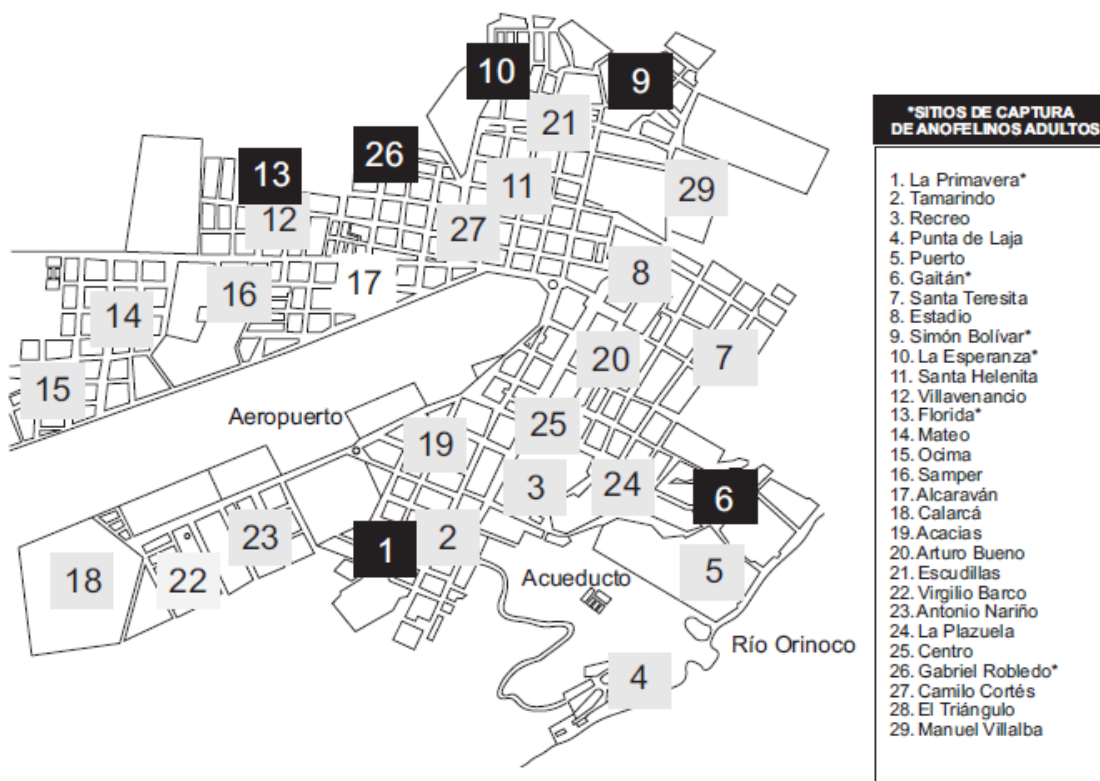


Figura 2 Sitios de captura de mosquitos adultos silvestres en Puerto Carreño, Vichada, Colombia 2009

Material entomológico

Se recolectaron anofelinos adultos silvestres que se hubiesen posado en personas (4), por un período de 50 minutos de cada hora entre las 18:00 y las 06:00 horas, por dos noches consecutivas de cada mes, desde marzo hasta diciembre de 2009. En el peridomicilio se evaluaron todos los meses, en tanto que las capturas en el intradomicilio se hicieron de marzo a julio debido a la renuencia de los jefes de hogar para llevar a cabo esta actividad. Con el fin de evitar sesgos en las capturas, los funcionarios responsables de la recolección de los mosquitos cambiaban de intradomicilio a peridomicilio cada hora de trabajo. Las hembras silvestres se colocaron en frascos de plástico rotulados con la información de campo y un algodón provisto con solución azucarada al 10 %. Se llevaron vivas al Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La oferta de sangre se hizo con *Mus musculus*, de acuerdo con los protocolos de manejo de vertebrados de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Se obtuvieron isofamilias mediante ovipostura forzada, retirando una pata y un ala de la hembra silvestre adormecida con acetato de etilo y colocándola luego sobre un recipiente con agua (5). Una fracción de huevos, la exuvia de la larva y la pupa, y el mosquito adulto emergido de esta ovipostura, constituyen una isofamilia. Todos estos estadios asociados se utilizaron para la determinación taxonómica de las especies a partir de caracteres morfológicos, usando

las claves disponibles (6-9). La fracción de los huevos que no eclosionó se almacenó en alcohol al 70 %, y la pata y el ala se montaron en láminas con bálsamo de Canadá.

Se confirmó la taxonomía de las especies pertenecientes al complejo *Albitarsis* a partir de la amplificación en cadena de la polimerasa del fragmento del gen *white* (10). Para cada especie se almacenaron muestras en la Colección de Referencia del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

La actividad de picadura se determinó para el intradomicilio y para el peridomicilio por cada mes de estudio y se definió como el número de mosquitos capturados por especie durante 50 minutos consecutivos, que se hubieran posado en personas (4). La infección natural por parásitos del género *Plasmodium* que afectan a los humanos, se determinó para todas las hembras silvestres a partir de la proteína del circumsporozoíto de *P. falciparum*, *P. vivax* VK210 y *P. vivax* VK247, utilizando el kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), distribuido por los *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC, Atlanta (11). Para ello, se utilizaron la cabeza y el tórax de cada hembra silvestre recolectada y se colocaron en grupos de cinco mosquitos de la misma especie con respecto a la hora, día y mes de captura. El punto de corte se calculó por el promedio de los controles negativos ± 2 desviaciones estándar con un valor de 0,250. Se consideraron positivos aquellos grupos que presentaron valores por encima del punto de corte. Los grupos de mosquitos que resultaron positivos se procesaron nuevamente en forma individual, utilizando el abdomen con el propósito de confirmar la infección por el agente etiológico y determinar el número total de especímenes positivos por grupo. Los controles negativos correspondieron a mosquitos de la colonia de *An. albimanus*, cepa Buenaventura, mantenida en el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

La infección natural se calculó como el porcentaje de mosquitos infectados para cada especie de *Anopheles* spp., con respecto a cada agente etiológico evaluado. La tasa de inoculación entomológica, entendida como el número de picaduras infectivas recibidas por una persona en un año, se calculó teniendo en cuenta la tasa de actividad de picadura y la tasa de infección natural por *Plasmodium* spp.

Aspectos éticos

Se contó con la aprobación de los Comités de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y de los *National Institutes of Health* de los Estados Unidos. Además, el *Institutional Review Board* del *New York State Department of Health* revisó este protocolo (N° 02-028^a) y encontró que no cumplía con la definición de regla federal común de investigación con sujetos humanos.

Las capturas de mosquitos *Anopheles* spp. que estuvieran picando personas, las desarrollaron funcionarios de la Secretaría Departamental de Salud de Puerto Carreño y de la Universidad Nacional de Colombia entrenados para realizar este tipo de actividades, quienes firmaron un consentimiento informado en el cual se les explicaron los objetivos y posibles riesgos de la actividad. Todos los funcionarios rotaron cada dos horas de sitio de captura durante el período de la misma.

A los jefes de los hogares donde se hicieron las capturas, se les informó el propósito del estudio, se les indicaron sus beneficios y riesgos y se les solicitó su consentimiento firmado para el desarrollo de la actividad. Para la alimentación de los mosquitos

silvestres, se siguieron los protocolos de manejo de vertebrados de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y del Comité de Ética en cuidado animal de la *Office of Laboratory Animal Welfare* (Assurance NJ A5791-01) de los *National Institutes of Health* y del *Institutional National Animal Care and Use Committee* del *New York State Department of Health*, según protocolo N° 11-420.

RESULTADOS

Se recolectaron 1.482 mosquitos adultos hembra de *Anopheles* spp., en 72 horas de captura en el intradomicilio y 192 horas en el peridomicilio. *Anopheles darlingi* fue la especie más abundante; permaneció activa durante toda la noche y registró dos picos de actividad de picadura: en el peridomicilio, entre 21:00-22:00 y 05:00-06:00 horas; y en el intradomicilio, entre las 21:00-22:00 y 04:00-05:00 horas. *Anopheles marajoara* s.s., evidenció un comportamiento crepuscular hasta las 21:00 horas, con un máximo de actividad de picadura entre las 18:00 y las 19:00 horas, tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio (Tabla 1-1, figura 1-3).

Se encontró un patrón unimodal en la distribución temporal para todas las especies recolectadas, con un pico en septiembre correspondiente a la época de lluvia, y uno mínimo en marzo correspondiente a la temporada seca. La variación mensual de la abundancia relativa de las especies con respecto a la precipitación para cada uno de los ocho meses estudiados, reveló que en junio y julio de 2009, correspondientes a los meses de mayor precipitación (más de 50 mm), la especie predominante fue *An. darlingi*, entre las 18:00 y las 22:00 horas en el peridomicilio. En los meses de transición, correspondientes a septiembre y octubre de 2009 cuando las lluvias reducen su intensidad, esta especie presentó una actividad de picadura constante toda la noche, con máximos de actividad durante las 18:00-19:00 horas, las 21:00-22:00 horas y hacia las 05:00-06:00 horas. En este mismo período, se observó un aumento en la abundancia relativa de *An. marajoara* s.s., *An. albitarsis* F y *An. braziliensis*, compartiendo una actividad de picadura crepuscular hasta las 21:00 horas. Se observó un aumento en la abundancia relativa de *An. marajoara* s.s., en el intradomicilio durante los meses de mayor precipitación.

Tabla 1 Abundancia relativa, actividad de picadura, e infección natural por parásitos del género Plasmodium que afectan a humanos en las especies de Anopheles spp., del municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia 2009

Especie	Abundancia Relativa de picadura	Valor máximo de actividad de picadura*	Número total de mosquitos capturados		Tasa de Infección natural	TIE*** Anual
			Intradomicilio	Peridomicilio		
<i>An. darlingi</i>	78,66% (n= 1166)	7,71 Peridomicilio 21-22 hrs	47	1119	0,008% (1/1166) <i>Plasmodium vivax</i>	1,6
<i>An. marajoara</i> s.s	10,25% (n= 152)	2,47 Peridomicilio 18-19 hrs	23	129	1,9% (3/152) <i>Plasmodium falciparum</i>	5,1
<i>An. albitarsis</i> s.l. ****	1,07% (n=16)	0,4 Intradomicilio 18-19 hrs	5	20	0	0
<i>An. braziliensis</i>	3,98% (n= 59)	1 Intradomicilio 0-1 hrs	6	53	0	0
<i>An. albitarsis</i> F	1,68% (n=25)	0,3 Intradomicilio 18-19 hrs	5	20	0	0
<i>An. argyritarsis</i>	0,20% (n=3)	0,09 Peridomicilio 18-19 hrs	0	3	0	0
<i>An. oswaldoi</i> s.l	0,13% (n=2)	0,09 Peridomicilio 5:-6: hrs	2	0	0	0
<i>Anopheles spp.**</i>	3,98% (n=59)		16	43	0	0
TOTAL	100% (n=1482)		1482			

*Actividad de picadura= número de mosquitos capturados/50 minutos/Hombre

** Anofelinos sin determinar por encontrarse en mal estado

*** Tasa de inoculación entomológica (TIE)

**** *An. albitarsis* s.l. DNA degradado, determinado por características morfológicas

Para la detección de infección natural por *P. falciparum*, *P. vivax* VK247 y *P. vivax* VK210, se procesaron 1.423 mosquitos, así: *An. darlingi* (n=1.166), *An. marajoara* s.s. (n=152), *An. braziliensis* (n=59), *An. albitarsis* F (n=25), *An. albitarsis* s.l. (n=16), *An. argyritarsis* (n=3) y *An. oswaldoi* s.l. (n=2). *Anopheles darlingi* (1/1166) se encontró infectado con *P. vivax* VK210, con una tasa de infección de 0,086 %. El mosquito infectado se capturó en noviembre de 2009 entre las 00:00-01:00 horas, en el peridomicilio. *Anopheles marajoara* s.s. (3/152) se encontró infectado con *P. falciparum*, con una tasa de infección de 1,97 % (Tabla 1-1). Los tres mosquitos infectados se capturaron en marzo entre las 18:00 y las 19:00 horas en el intradomicilio, septiembre, entre las 19:00 y las 20:00 horas, y noviembre, entre las 23:00 y las 24:00 horas en el peridomicilio.

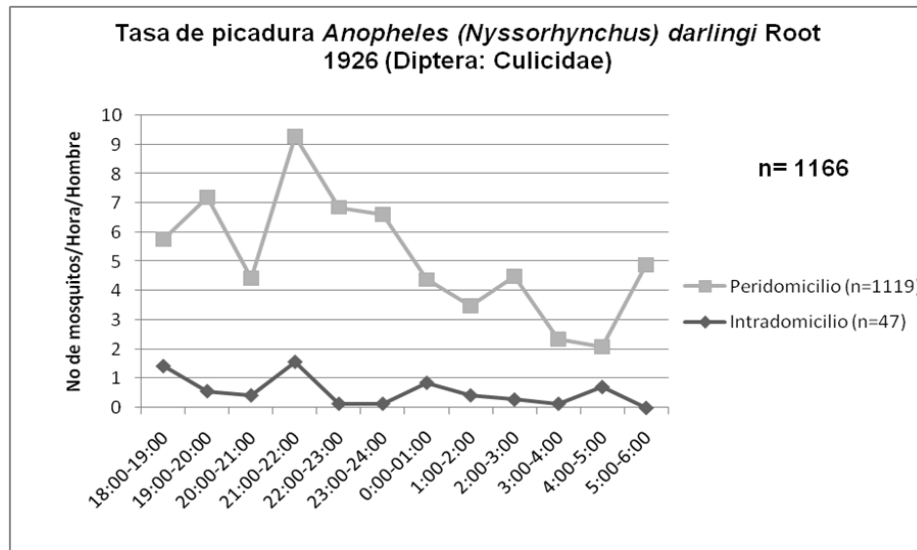
La tasa promedio de actividad de picadura correspondió a 5,1 para *An. darlingi* y 0,73 para *An. marajoara* s.s., picaduras por persona por noche registrada en 23 noches de capturas. La tasa de inoculación entomológica fue de 1,5 para *An. darlingi* y de 5,1 para *An. marajoara* s.s. Con este valor se estimó que una persona puede recibir cinco

picaduras infectivas por año de *An. marajoara* s.s. y dos picaduras por año de *An. darlingi*

DISCUSIÓN

La Secretaría de Salud de Vichada registra a *An. darlingi* como el principal vector de malaria para Puerto Carreño y es hacia esta entidad biológica que se dirigen todos los esfuerzos de control durante los brotes o epidemias (12). Evidentemente, esta especie resultó ser la más abundante picando a humanos durante toda la noche, con un comportamiento de alta plasticidad tanto exofágico como endofágico característico de la especie (9,13-19). Durante el estudio se registró un valor promedio de tasa de picadura de 5,15 hembras por hombre por noche con valores que oscilaron entre 0,08 y 16,60 hembras por persona por noche. En Puerto Carreño, estos valores pueden ser mayores, siendo similares a los registrados para América, donde se ha encontrado que la tasa de picadura para la especie es variable, con registros que van desde 0,13 hasta 1.443,00 hembras por persona por noche (14-20); en este estudio no se evaluaron todos los meses para el intradomicilio, lo que constituye un sesgo de captura para el análisis de la información.

El valor de la tasa de inoculación entomológica de dos picaduras infectivas por persona por año, similar al encontrado en otras áreas de transmisión de malaria con prevalencia por *P. vivax* en América (19-20) al igual que en la zona de estudio, aunado a los picos de mayor actividad de picadura a humanos cuando se encuentran sin protección, permiten incriminar a *An. darlingi* como responsable de la transmisión de este agente etiológico en el área urbana de Puerto Carreño



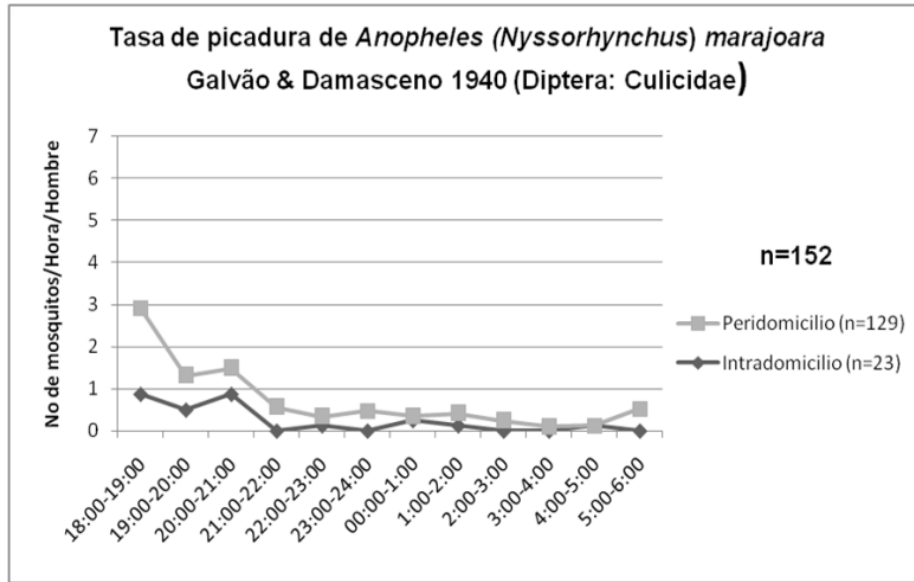


Figura 3 Tasa promedio de picadura por hora por hombre de *Anopheles darlingi* y *An. marajoara* s.s en el área urbana de Puerto Carreño, Vichada 2009

En Colombia no se considera a *An. marajoara* s.s como vector de malaria a pesar de haberse encontrado naturalmente infectado con *P. falciparum* (21), experimentalmente infectado con *P. vivax* (22) y con un comportamiento preferentemente endofílico (23,24). Sin embargo, en el área urbana de Puerto Carreño su importancia epidemiológica es evidente debido a su infección natural por *P. falciparum* con una tasa de inoculación entomológica de cinco picaduras infectivas por persona por año, a los sitios de cría próximos a las viviendas (no se incluyen los datos) y a la mayor actividad de picadura cuando la población humana se encuentra expuesta ya que debido a la temperatura ambiental, los pobladores dejan abiertas las puertas de sus casas o realizan sus actividades en el peridomicilio.

Estos resultados son relevantes si se tiene en cuenta, además, que para Colombia se han registrado dos acervos genéticos, uno asociado con mayor capacidad vectorial ubicado al oriente de la Cordillera Oriental con una estructura genética de la población similar a la de los vectores primarios de malaria (25), a su oportunismo y capacidad de adaptación a cambios hechos por el hombre, desplazando incluso al vector primario reconocido en la zona (26). Es probable, entonces, que *An. marajoara* s.s. junto con *An. darlingi* estén contribuyendo a mantener el carácter endémico de la malaria durante todo el año en Puerto Carreño (Vichada).

Anopheles albitarsis F registra un comportamiento de picadura preferentemente crepuscular hasta las 22:00 horas y la especie se halla activa solamente hasta las 01:00 horas, tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio (27-29). Aunque no se encontró a esta entidad biológica infectada naturalmente por parásitos del género *Plasmodium*, su simpatria y similitud en aspectos de su biología con *An. Marajoara* s.s. determinan la importancia de intensificar la vigilancia entomológica para esta especie.

Existe una dinámica compleja de transmisión de malaria en el área urbana y periurbana de Puerto Carreño, por diversos factores, entre los cuales están: los cambios en las características geográficas derivados de las actividades económicas prevalentes en la población humana de la región, como son la excavación de suelos para obtener materiales de construcción para vivienda y el uso intensivo del suelo para ganadería; las variaciones en factores climáticos críticos determinantes en la epidemiología de la enfermedad, como son la temperatura ambiente y la precipitación determinados por fenómenos como ENSO (El Niño/La Niña-*Southern Oscillation*) (30,31); la diversidad étnica y la costumbre de la población indígena de automedicarse; el conflicto armado que determina una demografía flotante, y la circulación de varios agentes etiológicos en diversas especies de vectores con características biológicas particulares (30-32).

Además, Puerto Carreño es el único centro con presencia de instituciones nacionales en el departamento, donde la población acude para diagnóstico y tratamiento en salud – entre otros–, y donde confluyen todas las actividades comerciales desde otros municipios del departamento, desde el interior del país y desde la República Bolivariana de Venezuela, por lo que su proceso de urbanización se desarrolla en forma acelerada y se presentan cambios ecológicos importantes para la transmisión de malaria, estable durante todo el año. La prevención, la vigilancia y el control deben estar enfocados al fortalecimiento de la capacidad institucional y de la participación intersectorial que permitan un diagnóstico adecuado, un tratamiento oportuno y un seguimiento particular a las poblaciones de indígenas y desplazados, ya que por las características culturales y de vulnerabilidad propias de estos grupos, la vigilancia epidemiológica no puede desarrollarse adecuadamente pues no aportan información sobre su sitio de procedencia específica o sobre automedicación previa.

Teniendo en cuenta los patrones de comportamiento de picadura registrados para *An. darlingi* y *An. marajoara* s.s. encontrados naturalmente infectados por *P. vivax* y por *P. falciparum*, respectivamente, en el área urbana de Puerto Carreño, las estrategias de control hacia estas especies deben orientarse a la implementación de toldillos de larga duración, con los cuales se esperaría, no sólo disminuir el contacto entre el humano y el vector por la barrera física que constituye, sino lograr una reducción en la densidad de la población y, particularmente en la longevidad de estas especies, característica fundamental para el desarrollo completo de los agentes etiológicos y su capacidad de transmisión (9-26). Esta estrategia, sumada al fortalecimiento de los programas de control de vectores de la Secretaría de Salud Departamental, particularmente la Unidad de Entomología (33) que permite el desarrollo de estudios complementarios en la población de vectores de malaria registrados en este estudio, relacionados con resistencia fisiológica a los insecticidas de uso en salud pública y evaluación de eficacia de las estrategias de control, son fundamentales para el control de la enfermedad.

Este estudio es básico para reorientar las estrategias de control en los vectores de malaria en Puerto Carreño, pero también constituye un llamado de atención sobre la necesidad de adelantar estudios entomológicos sistemáticos locales que le permitan al país conocer su realidad epidemiológica y entomológica en concordancia con los cambios del último milenio.

Referencias

1. **Equipo de Salud Pública Municipal. Plan Municipal de Salud Pública 2008-2011.** Puerto Carreño, Vichada: Alcaldía Mayor Municipal; 2008. p. 6-7.
2. **Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** Diccionario Geográfico de Colombia. Bogotá: Replolaser Ltda.; 1996. p. 2328-9.
3. Instituto Nacional de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2009.
4. **World Health Organization.** Manual of practical entomology in malaria. Methods and techniques. Geneva: WHO; 1975. p.13.
5. **Estrada DA, Quiñones ML, Sierra DM, Calle DA, Ruiz F, Erazo HF, et al.** Utilidad de la morfología de los huevos como método indirecto para identificar *An. benarrochi*, *An. oswaldoi*, y *An. rangeli* en Putumayo, Colombia. *Biomédica.* 2003;23:388-95.
6. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia, claves taxonómicas y notas de distribución. Cali: Universidad del Valle; 2007. p. 237.
7. **Faran M.E.,** A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Contrib Am Entomol Inst.* 1980;15:1-215.
8. **Faran ME, Linthicum KJ.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst.* 1981;13:1-81.
9. **Rubio-Palis Y.** *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Maracay: Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental; 2000. p. 120.
10. **Merritt TJS, Young CR, Vogt RG, Wilkerson RC, Quattro JM.** Intron retention identifies a malaria vector within the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *Albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol.* 2005;35:719-24.
11. **Wirtz RA, Burkot TR, Graves PM, Andre RG.** Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J Med Entomol.* 1987;24:433-7.
12. **Olano V, Brochero H, Sáenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica.* 2001;21:402-3.
13. **Rubio-Palis Y.** Observaciones sobre el patrón de actividad hematofágica del vector de la malaria *Anopheles darlingi* en las poblaciones del sur de Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* 1995;35:66-70.
14. **Voorham J.** Intra-population plasticity of *Anopheles darling* (Diptera: Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. *Rev Saude Publ.* 2002;36:75-80.
15. **Elliott R.** The influence of vector behaviour on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 1972;21:765-63.

16. **Forattini OP.** Comportamento exofilo de *Anopheles darlingi* Root, em regio meridional do Brasil. Rev Saúde Públ. 1987;21:291-304.
17. **Tadei W, Thatcher B, Santos J, Scarpassa V, Rodrigues I, Rafael M.** Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:325-35.
18. **Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly, Fouque F.** *Anopheles darlingi* bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazomian forest, French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:702-10.
19. **Forattini OP.** Comportamento exofilo de *Anopheles darlingi* Root, em regio meridional do Brasil. Rev Saúde Públ.1987;21:291-304.
20. **Magris M, Rubio-Palis Y, Menaes C, Villegas L.** Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River Southern Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:303-11.
21. **Herrera S, Suárez M, Sánchez G, Quiñones ML, Herrera M.** Uso de la técnica inmunorradiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoítos de *Plasmodium*. Colombia Médica. 1987;18:2-6.
22. **Collins WE, Warren M, Skinner JC, Sutton BB.** Infectivity of two strains of *Plasmodium vivax* to *Anopheles albicans* mosquitoes from Colombia. J Parasitol. 1985;71:771-3.
23. **Brochero H, Rey G, Buitrago LS, Olano VA.** Biting activity and breeding sites of *Anopheles* species in the municipality Villavicencio, Meta, Colombia. J Am Mosq Control. 2005;21:182-6.
24. **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.2006;26:269-77.
25. **Brochero HL, Li C, Wilkerson R, Conn JE, Ruiz-García M.** Genetic structure of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *marajoara* (Diptera: Culicidae) in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:585-95.
26. **Conn JE, Wilkerson RC, Segura MN, De Souza RT, Schlichting CD, Wirtz R, et al.** Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and land use. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:18-22.
27. **Wilkerson RC, Parson TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J.** Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. J Med Entomol. 1995;32:697-704.
28. **Rosa-Freitas MG.** *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *deaneorum*: A new species in the albitarsis complex (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:535-43.
29. **Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE.** Cryptic species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence

- between RAPD-PCR identification and analysis of mtDNA *COI* gene sequences. *Ann Entomol Soc Am.* 2005; 98:908-17
30. **Mantilla G, Oliveros H, Barnston AG.** The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960-2006. *Malar J.* 2009; 8:6.
 31. **Poveda G, Rojas W, Quiñones M, Vélez I, Mantilla R, Ruiz D, et al.** Coupling between annual and ENSO timescales in the malaria-climate association in Colombia. *Environ Health Perspect.* 2001;109: 489-93.
 32. **Stresman GH.** Beyond temperature and precipitation: Ecological risk factors that modify malaria transmission. *Acta Tropica.* 2010; 116:167-72.
 33. **Brochero H, Quiñones L.** Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. *Biomédica.* 2008; 28:18-24

1.2 Sitios de Cría de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Irene Jiménez¹, Jan E. Conn^{2,3}, Helena Brochero¹

Breeding sites of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Puerto Carreño Municipality, Vichada, Colombia

1. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia
2. Griffin Laboratory, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Slingerlands, NY 12159, USA
3. Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State University of New York at Albany, Albany, NY 12222, USA

Sometido a Revista Biomédica, Julio 2013.

Resumen

Introducción. La caracterización de los sitios de cría de anofelinos permite focalizar las estrategias de control dirigidas a formas inmaduras de los vectores de malaria. **Objetivo.** Caracterizar los sitios de cría del género *Anopheles* en el área urbana y periurbana de Puerto Carreño, Vichada, Orinoquía, Colombia. **Materiales y métodos.** Entre febrero y diciembre de 2009 se inspeccionaron posibles sitios de cría para anofelinos en Puerto Carreño, estos fueron agrupados en tipos de acuerdo a sus características generales. La determinación taxonómica se realizó con base en series entomológicas. **Resultados.** Se caracterizaron 21 criaderos agrupados en 7 tipos: excavación (n= 7) pastizal inundado (n= 4), caño (n= 3), estanque piscícola (n= 2), remanso de río (n=2), charco (n=2) y Laguna (n=1). Se registraron en orden de abundancia: *Anopheles albitarsis* s.l (49,6%), *Anopheles darlingi* (24,6%), *Anopheles braziliensis* (23,0%), *Anopheles oswaldoi* s.l y *Anopheles argyritarsis* ambas con 2,8%. Se determinó la presencia de *An. albitarsis* F a partir de la amplificación del gen *white*. **Conclusión:** *An. albitarsis* s.l y *An. darlingi* estuvieron presentes durante todo el año, el primero con preferencia a sitios de cría hechos por el hombre y el segundo, más asociado a criaderos naturales más alejados de las viviendas.

Palabras clave: *Anopheles*, malaria, sitios de cría, Colombia

Abstract

Breeding sites of *Anopheles* (Díptera: Culicidae) in Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Introduction. The characterization of anopheline breeding sites can guide control strategies aimed at immature malaria vectors. Objective. To characterize the main *Anopheles* breeding sites in Puerto Carreño, Vichada- Colombia. **Materials and Methods.** Between February and December 2009 anopheline breeding habitats were inspected and characterized in Puerto Carreño, Vichada. These were agrouped in types according to general characteristics. Taxonomic identification was based on entomological series. **Results.** During the study, 8 samples were taken from 7 types of larval habitats: excavations (n=7), flooded pastures (n= 4), spouts (n= 3), fishpond (n= 2), river backwater (n=2), puddles (n=2), and lagoon (n=1). 21 breeding sites were grouped in seven types: excavation (n= 7), flooded pasture (n= 4), spout (n= 3), fish ponds (n= 2), river backwater (n=2), puddle (n=2) and lagoon (n=1), In order of abundance the species found were *Anopheles albitarsis* s.l (49,6%), *Anopheles darlingi* (24,6%), *Anopheles braziliensis* (23,0%), *Anopheles oswaldoi* s.l y *Anopheles argyritarsis* whit 2,8%. The presence *An. albitarsis* F was determined based on amplification of the white gene. **Conclusion:** *An. albitarsis* s.l and *An. darlingi* were found throughout the year; the first exhibited preference by manmade breeding sites, and second was more associated whit natural breeding sites, fur away from the houses

Key words: *Anopheles*, malaria, breeding sites, biology, disease vectors, Colombia.

Introducción

Puerto Carreño es la capital del departamento del Vichada (6°11'16" LN; 62°28'23" LO) y corresponde a zona de sabana en la Orinoquia colombiana donde confluyen el río Meta y el río Orinoco en la franja fronteriza con Venezuela. Como municipio tiene una extensión territorial de 12.409 km² donde el área urbana corresponde al 76,9 % (1). Registra una altitud de 51 msnm, una temperatura media promedio anual de 28,5 °C, una precipitación media anual de 2.059 mm, un régimen monomodal de lluvias que va de abril a noviembre y un periodo seco desde diciembre a marzo (2) (Figura 1). Las principales actividades económicas están enfocadas en la ganadería, agricultura, minería extractiva y comercio, lo que ha acelerado el proceso de urbanización e incrementado la deforestación del área periurbana (3). En 2009, Puerto Carreño tuvo una incidencia anual parasitaria de 8,4 por 1.000 habitantes con una prevalencia de 6,1 para *Plasmodium vivax*, 1,5 para *P. falciparum* y 0,5 para malaria mixta (4). Según la información epidemiológica de la Secretaría de Salud Departamental no se registra transmisión de malaria urbana y se indica que el 8% de los casos registrados en este municipio proviene del área periurbana. Por ser capital departamental, Puerto Carreño recibe población humana flotante desde áreas endémicas para malaria que llegan acudiendo por servicios de las instituciones del Estado o que son desplazadas por el conflicto armado que sufre el departamento, lo que aunado al riesgo fronterizo con Venezuela, donde la malaria también es un problema de salud pública, determina escenarios complejos para el establecimiento y transmisión de la malaria.

Con el propósito de focalizar las estrategias de control dirigidas a formas inmaduras de los vectores de malaria en Puerto Carreño, se caracterizaron los sitios de cría con base en la obtención de series entomológicas para determinar la composición de especies en concordancia con las características propias de cada criadero.

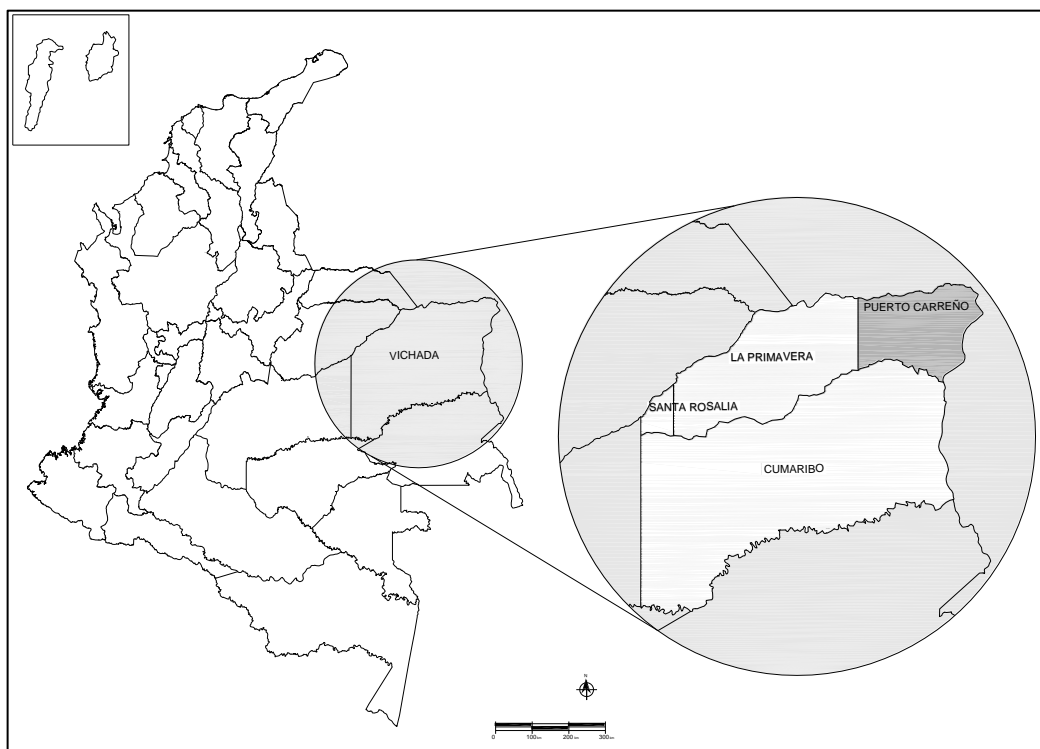


Figura. 1 Ubicación geográfica de Puerto Carreño, Vichada, Colombia

Materiales y Métodos

Caracterización de sitios de cría: De acuerdo con información preliminar del sistema de vigilancia entomológica de la Secretaría de Salud Departamental, el estudio se realizó en seis barrios de Puerto Carreño (Figura 2) durante 8 meses entre marzo y diciembre de 2009.

De acuerdo con información preliminar del sistema de vigilancia entomológica de la Secretaría de Salud Departamental de Puerto Carreño, se visitaron posibles sitios de cría para vectores de malaria en cada barrio. Cada criadero con formas inmaduras de anofelinos o potencial para su cría, se describió teniendo en cuenta: 1) Temporalidad (permanente/temporal); área aproximada expresada en metros; distancia en metros a la vivienda más cercana; exposición a la luz directa del sol (sombra total/parcial/ninguna); vegetación asociada (emergente, flotante o circundante) (5-6).

En cada sitio de cría se realizaron por lo menos 30 inmersiones usando un cucharón blanco con capacidad de 500ml recolectando el mayor número de formas inmaduras de

anofelinos presentes (7) Las formas inmaduras se colocaron en tubos de plástico con agua del mismo criadero de origen, se etiquetaron con el código asignado a sitio de cría y se transportaron vivas al Laboratorio Entomología de la Facultad de Agronomía en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, con el propósito de obtener serie entomológicas. Debido a que se recolectaron tanto larvas como pupas, una serie entomológica completa correspondió a la exuvia de larva de IV estadio, exuvia de la pupa y el correspondiente adulto emergido, en tanto que una serie incompleta solo contó con exuvia de pupa y adulto emergido (8).

Composición de especies: La determinación taxonómica se realizó a cada estadio asociado de cada serie entomológica a partir de caracteres morfológicos (9-10). Para los especímenes pertenecientes al Complejo *Albitarsis* se realizó confirmación taxonómica molecular a partir de la amplificación en cadena de la polimerasa del fragmento del gen *white* (11).

Aspectos Éticos:

Para la recolección de formas inmaduras se siguieron los protocolos del Comité de Ética en cuidado animal de la *Office of Laboratory Animal Welfare* (Assurance N| A5791-01) de los *National Institutes of Health* y del *Institutional National Animal Care and Use Committee* del *New York State Department of Health*, según protocolo N° 11-420.

Resultados

Caracterización de sitios de cría: Se inspeccionaron 21 sitios de cría correspondientes a siete tipos de criaderos (Cuadro 1). En todos se registraron formas de inmaduras para anofelinos en alguno de los meses muestreados.

Como criaderos permanentes y naturales (Figura 2) se registraron: 1) Laguna con ubicada a 400 metros del barrio Gaitán, se caracterizó por presentar materia orgánica con agua de color marrón con abundante vegetación circundante y flotante; 2) Caños que correspondieron a riachuelos con corriente lenta de agua que pueden incrementar su caudal de acuerdo con la intensidad de lluvias provocando desbordamientos localizados. Las formas inmaduras se localizaron en áreas de los caños sombreados y con vegetación herbácea y arbustiva circundante; 3) Remansos de ríos que correspondieron a extensas inundaciones de grandes ríos como el Orinoco y Meta, que por lo general se encontraron expuestos a la luz directa del sol. La especie predominante en estos sitios de cría correspondió a *An. darlingi*, en tanto que *An. albitarsis* s.l., se encontró en menor abundancia en laguna y remanso de río.

Como criaderos hechos por el hombre (Figura 2), se encontraron: 1) Excavaciones como resultado de la extracción de material del suelo usado para la construcción de viviendas en el municipio. Siempre están expuestas a la luz directa del sol, algunas en temporada seca pueden secarse completamente mientras que en temporada de lluvia debido a su abandono, pueden presentar vegetación circundante, flotante y emergente constituyendo sitios de refugio para las formas inmaduras de anofelinos.

Tabla. 1 Presencia de las especies de *Anopheles* en 21 criaderos indicando preferencias por tipo de habitad (N= número de criaderos revisados para cada tipo; n= número de series obtenidas por especie)

Tipo de Criadero/ Especie	Sitios de cría permanentes				Sitios de cría Temporales								Total N=21		
	Excavación		Caño		Estanque Piscícola		Laguna		Pastizal Inundado		Remanso de río			Charco	
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%		n	%
<i>An. albitarsis</i> s.l	111	58,7	0	0	47	24,8	5	2,6	10	5,2	1	0,5	15	7,9	189
<i>An. albitarsis</i> F*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	3
<i>An. darlingi</i>	6	6,1	7	81,9	7	7,2	3	3	0	0	2	2	0	0	97
<i>An. braziliensis</i>	42	47,1	0	0	6	6,7	1	1,1	2	2,2	1	1,1	37	41,5	89
<i>An. oswaldoi</i> s.l	1	14,2	6	85,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>An. argyritarsis</i>	2	50	0	0	0	0	2	50	0	0	0	0	0	0	4

* *An. albitarsis* F determinado a partir la amplificación del gen *white*

2) Los estanques piscícolas corresponden a excavaciones en el suelo que se inundan artificialmente con agua del río con el propósito de generar cultivo de peces en condiciones controladas. Se encuentran cercanos a las viviendas, están permanentemente expuestos a la luz del sol y pueden o no presentar vegetación circundante y flotante dependiendo del mantenimiento de los propietarios. En estos criaderos se encontró predominantemente *An. albitarsis* sl y *An. braziliensis*.

Los charcos y pastizales inundados correspondieron a criaderos temporales generados por la acumulación de agua lluvia y desbordamiento de ríos o caños en depresiones del suelo. Pueden estar expuestos o no totalmente a la luz del sol, con poca profundidad, abundante materia orgánica en descomposición y con vegetación emergente asociada. En estos, no se encontró *An. darlingi* durante los 8 meses de muestreo.

Composición de especies: Todas las especies registradas correspondieron al subgénero *Nyssorhynchus*, encontrándose en orden de abundancia: *Anopheles albitarsis* s.l (49,6%), *Anopheles darlingi* (24,6%), *Anopheles braziliensis* (23,0%), *Anopheles oswaldoi* s.l y *Anopheles argyritarsis* representando el 2,8%.

An. albitarsis s.l se registró durante todos los meses de muestreo siendo más frecuente en el mes de Agosto y siempre asociada a criaderos de origen antrópico con exposición directa a la luz del sol. A partir de la amplificación del gen *white* se determinó la presencia de *An. albitarsis* F (n=3) (Cuadro 1). *An. darlingi* se registró preferencialmente

en sitios de cría naturales pero también se recolectó en estanques piscícolas. Esta especie, fue más frecuente en el mes de Marzo al inicio de la temporada de lluvias y menos frecuente en los meses de mayor precipitación correspondientes a Junio y Julio. *An. braziliensis* se encontró en todos los criaderos con excepción de los caños y fue más frecuentemente registrada en el mes de Noviembre cuando finaliza la temporada de lluvias.

Discusión

Puerto Carreño es un importante conglomerado de viviendas que constituyen el área urbana, con vías pavimentadas, servicios básicos de acueducto, alcantarillado y recolección de desechos, y zonas con infraestructura para instituciones prestadoras de servicios, tanto públicas como privadas. Por ser capital departamental recibe población humana flotante durante todo el año desde áreas con alta transmisión de malaria, muchas de las cuales inician su asentamiento en áreas periurbanas sin ninguna planificación. Esto deriva en viviendas precarias hechas con madera y plásticos que permiten el permanente ingreso de insectos a su interior y zonas donde los servicios básicos no tienen cobertura por lo que los habitantes hacen uso extractivo de materiales del suelo para construcción de tanques de reserva de agua para consumo y labores domésticas. Las características geográficas y ecológicas propias de este municipio, aunado a estos importantes cambios en el paisaje determinan que en Puerto Carreño puedan existir casos autóctonos de malaria e incluso, de que pueda existir transmisión inestable (12).

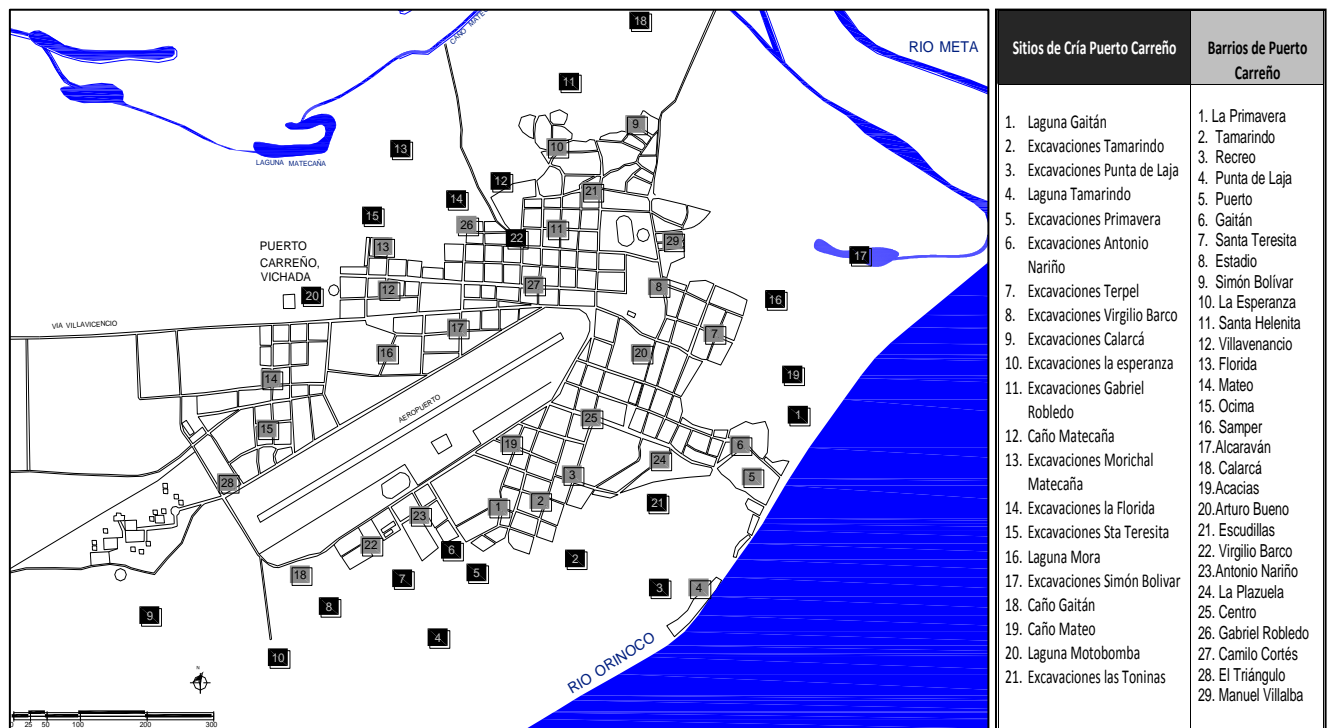


Figura. 2 Sitios de Cría de Anopheles spp., en Puerto Carreño, Vichada 2009

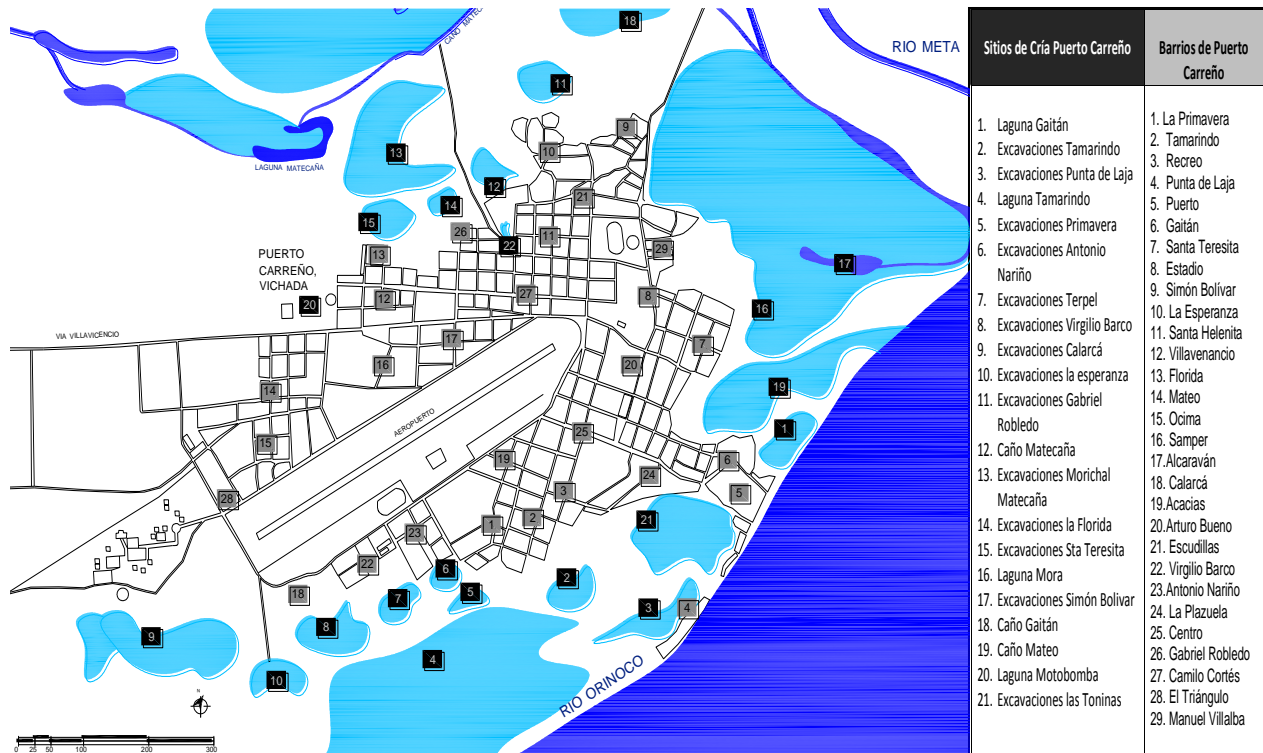


Figura. 3 Sitios de Cría de *Anopheles* spp., en época de lluvia en Puerto Carreño, Vichada 2009

En este contexto, este estudio encontró que las excavaciones fueron los sitios de cría más numerosos y más favorables para el desarrollo de diversas especies de anofelinos, posiblemente debido a que constituyen un hábitat permanente y la presencia de abundante vegetación que suministra refugio y alimento para las larvas (13 -14). El uso del suelo para excavaciones y formación de estanques para cría de peces es un aspecto cultural muy arraigado en la población del departamento del Vichada ya que constituye un sustento económico directo y una mayor posibilidad de asentamiento en las áreas periurbanas, razón por la cual se encuentran muy cercanos a las viviendas. El control de estos sitios de cría puede estar enfocado a programas de participación con la comunidad para el relleno de excavaciones abandonadas, manejo adecuado de los reservorios de agua, y el desbroce y remoción de vegetación circundante de los estanques piscícolas lo que permitiría la depredación de larvas por los peces. No obstante, estas acciones pueden ser muy demandantes, debido a los costos económicos y al tiempo por la regularidad que requieren, por lo cual los larvicidas siguen siendo la elección cuando se presenten brotes o epidemias de malaria en la zona.

En excavaciones y estanques piscícolas, la especie más frecuente durante este estudio fue *An. albitarsis* s.l, lo que concuerda con otros estudios donde se evidencia la preferencia de esta especie por sitios de cría permanentes derivados de la intervención antrópica, con poca profundidad y con exposición directa a los rayos del sol (15- 16). Esto es muy importante debido a que este oportunismo de la especie por colonizar criaderos permanentes cercanos a las viviendas, permite el incremento de su

abundancia, incluso por encima de los vectores primarios como *An. darlingi*, conllevando a cambios en las dinámicas de transmisión local de malaria, fenómeno que se ha observado en zonas con cambios bruscos del ecosistema derivados del uso intensivo del suelo (15). Debido a que *An. albitarsis* si se encontró naturalmente infectada en Puerto Carreño, tanto por *P. vivax* como por *P. falciparum* con tasas de inoculación entomológica 5,1 (17) esta posibilidad cobra particular importancia por lo que debe intensificarse la vigilancia entomológica para esta especie con el propósito de realizar estudios a largo plazo que permitan determinar los miembros del complejo existentes en la zona, asociarlos con aspectos de su biología, estacionalidad, dinámicas de procesos de intervención antrópica y definir su rol en la transmisión de la malaria.

Históricamente, *An. darlingi* se ha reportado como el vector primario de malaria en Puerto Carreño (17-18) y siempre ha sido asociada a criaderos naturales (19). Este estudio reveló que *An. darlingi* ocupa una gran diversidad de hábitats, con preferencia en agua dulce, no contaminada y con sombra parcial, protegidos de los rayos directos del sol; condiciones generalizadas para esta especie en las Américas (20-23) Aunque esta especie puede adaptarse a sitios de cría hechos por el hombre próximo a viviendas, debido a que esta especie registra rangos de vuelo amplios (23) se cree que para Puerto Carreño los mosquitos adultos llegan desde criaderos alejados ubicados preferiblemente en zonas urbanas y que no fueron muestreados en este estudio. En este contexto, el control de formas inmaduras de *An. darlingi* en Puerto Carreño se torna muy difícil ya que los remansos de ríos, uno de sus principales sitios de cría, abarcan grandes extensiones del suelo. Por tanto, teniendo en cuenta que se encontró a esta especie naturalmente infectada por *P. vivax* en Puerto Carreño con una actividad de picadura en el intradomicilio entre las 21-22hr y las 4-5hr (17), las estrategias de control deben enfocarse en sus formas adultas.

En cuanto a la estacionalidad no fue posible evidenciar un patrón marcado de distribución temporal para las especies de *Anopheles* recolectadas. Sin embargo, *An. albitarsis* s.l. presentó su mayor frecuencia entre agosto y octubre con un máximo en el mes de agosto, justamente un mes después del pico de lluvia, cuando los criaderos de origen antrópico como excavaciones, y estanques piscícolas se estabilizan. Esta especie presentó una menor frecuencia entre los meses de marzo y abril cuando se inicia la temporada de lluvias. Es decir, se encontró consistencia entre la frecuencia de formas inmaduras registrada en este estudio y la abundancia determinada para adultos de esta especie en Puerto Carreño (17).

An. darlingi presentó su mayor frecuencia en marzo, uno de los meses con escaso registro de precipitación (<20mm) y una menor frecuencia en los meses con mayores registros de precipitación correspondientes a Junio y Julio (>50mm). Esto puede ser explicado debido a que la especie coloniza prolíficamente los criaderos que se generan al inicio de las lluvias, pero sus formas inmaduras pueden ser arrastradas cuando éstas se intensifican. La mayor abundancia para adultos de esta especie para el mismo año de estudio en Puerto Carreño se registró en el mes de Septiembre (17) por lo que no se encontró relación con respecto a la frecuencia de formas inmaduras reportadas en este estudio. Varios estudios han considerado que los cambios en la abundancia relativa de *An. darlingi* no solo dependen de la precipitación sino que responden a interacciones entre la disponibilidad de sitios de cría, el nivel de los ríos y variables ambientales determinando fluctuaciones estacionales y temporales en su densidad poblacional (22,24-26). En Puerto Carreño la baja frecuencia de formas inmaduras registrada para

An. darlingi podría ser explicada debido a: (i) los tipos de criaderos visitados; (ii) el número de muestreos realizados por criadero, y (iii) la muerte de las larvas durante el transporte al laboratorio de entomología para la obtención de series entomológicas.

An. braziliensis mostró ser una especie con alta plasticidad para adaptarse a sitios de cría tanto naturales como hechos por el hombre, lo que aunado a registros de infección natural por parásitos del género *Plasmodium* que afecta a humanos en algunas zonas de la Amazonia (27) implica una vigilancia entomológica atenta para esta especie en Puerto Carreño. Aunque *An. oswaldoi* s.l se encontró en muy baja frecuencia en formas inmaduras y en adultos en Puerto Carreño (17) no debe descuidarse su vigilancia debido a que ha sido descrito como un complejo de especies (28) y en algunas ocasiones confundida con vectores de importancia para malaria como *An. benarrochi* B (29-30).

El Ministerio de Salud y Protección Social, el Instituto Nacional de Salud y la Secretaría Departamental de Salud de Vichada han definido el uso de biolarvicidas (*Bacillus sphaericus*) para el control de formas inmaduras de vectores de malaria en este tipo de criaderos (31). El *B. sphaericus* se aplica a los cuerpos de agua sin conocimiento de los factores fisicoquímicos y bióticos (temperatura del agua, el pH, la exposición a la luz del sol, entre otros) que permita determinar su eficacia. Debido a que no se cuenta con otros biolarvicidas aprobados por las autoridades de salud y que se ha registrado resistencia fisiológica de anofelinos a *B. sphaericus* (32) debe enfatizarse la vigilancia entomológica para este fenómeno.

Las acciones de control dirigidas a formas inmaduras en Puerto Carreño se tornan complejas y costosas debido a múltiples factores: 1) la múltiple variedad de sitios de cría; 2) la percepción de sus habitantes, que los usan para su sustento económico y mejoras de asentamiento; y 3) la ecología propia de esta zona de la Orinoquia que presenta un régimen monomodal de lluvias de 8 meses al año. Por tanto, las estrategias de control en temporada de lluvia deben estar dirigidas hacia los adultos mediante la implementación de telas impregnadas con insecticidas de larga duración, con los cuales se esperaría, no sólo disminuir el contacto entre el humano y el vector por la barrera física que constituye, sino lograr una reducción en la densidad de la población y, particularmente en la longevidad de estas especies, característica fundamental para el desarrollo completo de los agentes etiológicos y su capacidad de transmisión (15,17,23). No obstante, debe procurarse la participación comunitaria activa con acompañamiento intersectorial a través de estrategias de Educación, Gestión y Comunicación (EGI) que permitan acciones para la adecuación del medio físico a través del relleno de excavaciones abandonadas, manejo adecuado de los reservorios de agua, y el desbroce y remoción de vegetación circundante de los estanques piscícolas lo que permitiría la depredación de larvas por los peces. Estas acciones, aunadas a un diagnóstico oportuno y un tratamiento adecuado de pacientes con malaria; instalación de puestos de monitoreo para seguimiento de personas asintomáticas provenientes de zonas con alta transmisión de malaria; y el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica y entomología, contribuirán a prevenir y controlar la transmisión de la malaria en Puerto Carreño en coherencia con las metas del milenio propuestas por Colombia para este evento de notificación obligatoria.

Agradecimientos

A la secretaría departamental de salud de Puerto Carreño, Vichada.

A Humberto Mosquera por el apoyo técnico en las salidas de campo y procesamiento de muestras en el laboratorio

Referencias

1. **Equipo de salud Pública municipal.** Plan municipal de salud pública 2.008 – 2.011. Puerto Carreño, Vichada. Alcaldía Mayor Municipal.2008.pg 6-7
2. **Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** Diccionario Geográfico de Colombia. Tomo IV. Bogotá: Reprolaser LTDA; 1996. Pg 2328-29
3. **De la Hoz J.** Geografía económica de la Orinoquia. Banco de la República de Colombia. 2009.p
4. **Instituto Nacional de Salud.** Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública-SIVIGILA; 2009. Inf Quinc Epidemiol Nac 51
5. **Brochero H, Rey G, Buitrago LS, Olano VA.** Biting activity and breeding sites of *Anopheles* species in the municipality Villavicencio, Meta, Colombia. J Am Mosq Control. 2005;21:182-6.
6. **Brochero H, Pareja PX, Ortiz G, Olano VA.** Sitios de críay actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el municipio de Cimitarra, Santander, Colombia. Biomédica.2006;26:269-77
7. **World Health Organization.** Manual of Practical entomology in malaria Vol II Methods and techniques. Geneva: WHO; 1975 pg 13
8. **Belkin J, Schick R, Galindo P, Aitken T.** Estudios sobre mosquitos (Diptera: Culicidae). Ia. Un proyecto para un estudio sistemático de los mosquitos de Mesoamérica. Ila. Métodos para coleccionar, criar y preservar mosquitos. Contrib Am Entomol Inst 1967;1:163-80
9. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia claves taxonómicas y notas de distribución. Universidad del Valle; 2007. 260pp.
10. **Faran ME, Linthicum KJ.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1981;13:1-81.
11. **Merritt TJS, Young CR, Vogt RG, Wilkerson RC, Quattro JM,** Intron retention identifies a malaria vector within the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *Albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). Mol Phylogenet Evol. 2005; 35:719–724.
12. **Padilla JC, Álvarez G, Montoya R, Chaparro P, Herrera S.** Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:114-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900015>
13. **Merritt RW, Dadd RH, Walker ED.** 1992. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. Ann Rev Entomol 37:349-376.
14. **Hall T F.** 1972. The influence of plants on anopheline mosquito breeding. Am J Trop Med Hyg 21:787-794.
15. **Conn J, Wilkerson RC, Segura M, De Souza R, Schlichting CD, Wirtz R, Povoá M.** Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. Am J Trop Med Hyg. 2002; 66:18-22.
16. **Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al.** The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data,

- distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors*. 2010;3:72. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-72>.
17. **Jiménez P, Conn J, Witz R, Brochero H.** *Anopheles* (Díptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia. *Biomédica*. 2012;32(Supl. 1):13-21.
 18. **Servicio de Erradicación de la Malaria SEM 1957.** *Plan para la erradicación de la malaria en Colombia, República de Colombia*, Ministerio de Salud Pública y Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, Vol II, Bogotá, 635 pp.
 19. **Olano V, Brochero H, Sáenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica*. 2001;21:402-3.
 20. **Fleming G.** *Biology and ecology of malaria vectors in the Americas*. Washington, DC: Pan American Health Organization, 1986, PNSP/86-72.
 21. **REJMÁNKOVÁ E, RUBIO-PALIS Y, VILLEGAS L.** 1999. Larval habitat of Anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J Vector Ecol* 24:130
 22. **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderon GI, Quiñones ML, Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, et al.** Malaria vector species in Colombia – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(Supl.1):223 38.<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028>
 23. **Rubio-Palis Y.** *Anopheles (Nyssorhynchus) de Venezuela: Taxonomía, Bionomía, Ecología e Importancia Médica*, Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental, Maracay, Venezuela; 2000. P.1-120.
 24. **Charlwood JD.** Biological variation in *Anopheles darlingi* Root 1926. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91:391-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000400001>
 25. **Berti J, Vanegas C, Amarista J, González J, Montañez H, Castillo M, Guzmán H, González J.** Inventario preliminar y observaciones biológicas sobre los anofelinos (Diptera: Culicidae) de una región minera del estado de Bolívar, Venezuela. *Bol Entomol Venez*. 1998; 13:17-26.
 26. **Ahumada ML, Pareja PX, Buitrago LS, Quiñones ML.** Comportamiento de picadura de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) y su asociación con la transmisión de malaria en Villavicencio (Meta, Colombia). *Biomédica*. 2013;33(2).
 27. **Deane LM, Causey OR, Deane MP.** Notas sobre a distribucao e a biología dos anofelinos das regions Nordeste e Amazonica do Brasil. *Braz Serv Espec Saúde Pública Rev*. 1948; 827-965
 28. **Deane LM.** Malaria vector in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81:5
 29. **Branquinho MS, Araújo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha RM, Taveira FA, Kloetzel JK.** *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996; 90:233
 30. **Ruiz F, Quiñones ML, Erazo HF, Calle DA, Alzate JF, Linton YM.** Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from Southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 155-60
 31. **Guía de Atención Clínica de Malaria**, Ministerio de protección social- Bogotá 2010
 32. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. 150 Informe del comité de expertos de la OMS en biología de vectores y lucha antivectorial. Geneve, 1992:784 (Serie Informes Técnicos; no 818)..

2. Capítulo

2.1 Malaria Vectors in San José del Guaviare, Orinoquia, Colombia

Irene Jiménez¹, Jan E. Conn^{2,3}, Helena Brochero¹

1. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia
2. Griffin Laboratory, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Slingerlands, NY 12159, USA
3. Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State University of New York at Albany, Albany, NY 12222, USA

Abstract. This study was conducted to determine *Anopheles* species composition and their natural infectivity by human *Plasmodium* in 2 localities with the highest malaria transmission in San Jose del Guaviare, Guaviare, Colombia. A total of 1,009 *Anopheles* mosquitoes were collected using human landing catches during 8 months in 2010. *Anopheles darlingi* was the most abundant (83.2%) followed by *An. albitarsis* s.l. (8.6%), *Anopheles braziliensis* (3.8%), *An. oswaldoi* s.l. (1%), and *An. rangeli* (0.3%). *Anopheles darlingi* showed the highest human biting rate, and it was found naturally infected with *Plasmodium vivax* VK210 (0.119%) using enzyme-linked immunosorbent assays. All species were collected biting both indoors and outdoors. *Anopheles darlingi* showed biting activity overnight with an indoor peak between 1200–0100 h.

Therefore, we recommend that malaria prevention strategies focus on 1) insecticide-treated nets to reduce human–vector contact when people are most exposed and unprotected; 2) accurate diagnoses; 3) adequate treatment for patients; 4) more timely epidemiological notification; and 5) improved entomological surveillance

Key Words: Malaria, *Anopheles*, biting activity, natural infectivity, Amazonia, Colombia

Introduction

In Colombia, malaria remains an important public health problem where transmission exhibits unstable, endemic–epidemic patterns with significant variability among different areas. There are 4 main transmission areas, all represented on the Pacific Coast: Urabá–Sinu´ Bajo Cauca; Amazonia, and Orinoquia (Padilla and Peña 2002, Padilla *et al.* 2011). The topography of Guaviare State is lowlands, located in the transition between Orinoquia and Amazonia regions of southeast Colombia (0°32' to 3°09' N; 69°47' to 73°47' W), and has an area of 42,327 km². Guaviare consists of the capital region where

the capital city San José del Guaviare is located, and 3 municipalities: El Retorno, Calamar, and Miraflores (SINCHI 2000) (Fig. 1). During the present study in 2010, Guaviare reported the highest average annual malaria parasite index (API) in Colombia, with a rate of 58.8/1,000 inhabitants, representing 39.2% of all malaria cases in Colombia. San José del Guaviare reported autochthonous malaria cases of 17.53 API attributed to *Plasmodium vivax* (Grassi and Feletti), 7.48 API inhabitants attributed to *P. falciparum* (Welsh), and 1.8 cases/1,000 inhabitants attributed to a mixture of *P. falciparum*/*P. vivax* (SIVIGILA 2011). In San José del Guaviare municipality, rural and peri-urban malaria transmission is aided by immigration of infected humans from areas with high malaria transmission and enhanced by the proliferation and intensification of the cultivation of illicit crops. Settlement of illegal armed groups and intensive land use contribute to abundant *Anopheles* breeding sites (Padilla *et al.* 2011).

The human population is 64.5% urban and 35.4% rural, and includes indigenous communities such as Sikuaní, Guayaberos, Tucano, Desano, Piratapuyo, and Nukak Maku' (SINCHI 1999). About 10 years ago, Guaviare State, and specifically San José del Guaviare, was one of the main cocaine trafficking localities in Colombia, with high rates of forced human displacement, which resulted in a permanent floating human population moving among rural, peri-urban, and urban settlements. Because the rural area of San José de Guaviare is affected by armed conflict, samples were collected based on locality accessibility and confirmation of local security.

In general, in Colombia, *Anopheles darlingi* Root is considered the primary vector (SEM 1957, González and Carrejo 2009, Montoya-Lerma *et al.* 2011). However, other species complexes, such as the Albitarsis Complex, have been found naturally infected by human *Plasmodia* in the Orinoquia > region in Colombia (Herrera *et al.* 1987, Jiménez *et al.* 2012). It is critical to determine if any of these species complexes play a role in local malaria transmission, and can be verified as a local or regional vector (Brochero and Quiñones 2008).

The present study was carried out in the rural area of San José del Guaviare to investigate *Anopheles* species composition and natural infectivity by human *Plasmodium* species in 2 localities with high malaria transmission, and to recommend possible prevention strategies, monitoring, and control of malaria.

Materials and methods

Study site: Two localities in the San José del Guaviare Municipality Agua Bonita-AB (N 02°34'43.8"- O 72°37'31,6") and El Progreso EP (02°32'17.4"N 72°39'31.3"O). were selected for the study. San José del Guaviare is a lowland forest ecoregion (Rubio-Palis and Zimmerman 1997) and is located at 180 m above sea level, with a mean annual precipitation of 2,800 mm (rainy season April to November; dry season December to March), mean temperature up to 26.5uC, and relative humidity .80% (IDEAM 2010).

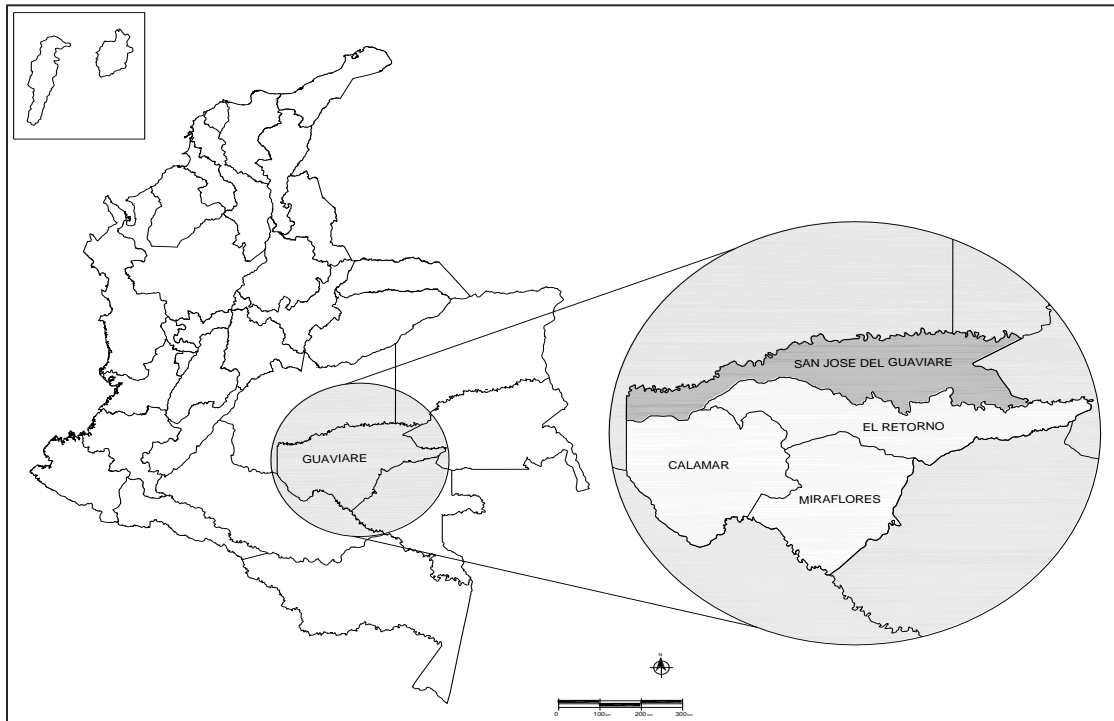


Figure 1 Map of Colombia with the Department of Guaviare enlarged showing the municipalities

Mosquito collection and species identification: Collections of adult mosquitoes by human landing catches (HLC) (WHO 1975) indoors and outdoors were carried out from 1800 h to 0600 h for 3 consecutive days per month for 8 months. Collectors rotated indoors/outdoors every 2 h to avoid sampling bias. Several isofamilies were reared from females collected by HLC. These females were allowed to feed on mice in the laboratory and 3 days later were induced to oviposit by cutting off 1 wing and hind leg prior to placing them in water containers (Estrada *et al.* 2003).

Larvae: were permitted to hatch from each oviposition and reared individually. Larval and pupal exuviae of link-reared specimens were stored in 75% ethanol prior to slide-mounting, following the protocols in González and Carrejo (2009).

Emerged adults were pinned and labeled @ with the same code as the mother for additional studies (Belkin *et al.* 1965). The protocol for mosquito feeding on mice was reviewed and approved by the National University of Colombia

Veterinary and Animal Care Faculty, and the Institutional National Animal Care and Use Committee of the New York State Department of Health, protocol No. 11-420. Taxonomic identification was conducted using morphological features in González and Carrejo (2009). Molecular taxonomic identification, based on the barcode region (Folmer *et al.* 1994; Ruiz *et al.* 2010, 2012), confirmed species in the Albitarsis Complex. Genomic DNA was obtained from the abdomen of each specimen (Zapata *et al.* 2007, Cienfuegos *et al.* 2008) using DNAeasy tissue kits (Qiagen, CA).

Natural infectivity status To determine the natural infectivity by *P. falciparum* and *P. vivax* (VK210 and VK247), all mosquitoes collected in both localities were pooled (5 mosquitoes/pool) based on time, date, month, and species, and analyzed by

enzymelinked immunosorbent assays (ELISA) (Wirtz *et al.* 1987a, 1987b, 1991, 1992).
Data analysis

The human-biting rate (HBR) was expressed as the number of bites per person per night (b/p/n) for the total sampling period, which corresponded to 576 h (288 indoor/288 outdoor) (WHO C 2008). The sporozoite rate was estimated as a percentage of CS-Plasmodium positive for mosquitoes per species divided by the total number of mosquitoes used by species. Infection rates were estimated using the mean absorbance value of negative controls plus 3 SD, with a fixed cutoff value that allowed for 20% variation in negative control absorbance values (Beier *et al.* 1988). The annual entomological inoculation rate (EIR) was determined as the sporozoite rate multiplied by the HBR, i.e., the mean number of female anopheline mosquitoes caught per night multiplied by 365 days (Macdonald 1957).

Ethical considerations Collection of wild adult mosquitoes by HLC was conducted under an informed consent agreement using a protocol and collection procedures that were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the National University of Colombia and by the Institutional Review Board of the New York State Department of Health, protocol No. 02-028. No additional ethical clearance was necessary.

Results

Species composition From both localities (AB and EP) a total of 1,009 *Anopheles* mosquitoes were collected over an 8-month period, based on 288 h for each of the indoor and outdoor samplings. Six *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) species were identified (Table 1). *Anopheles darlingi* occurred throughout the year and was the most abundant species (83.2%, n=840) of the total identified. *Anopheles albitarsis* (Lynch-Arribalzaga) s.l. accounted for 8.6% (n=87), followed by *An. braziliensis* (Chagas) at 3.8% (n=39), *An. oswaldoi* (Peryassu) s.l. (n =10), *An.rangeli* (Gabaldon, Cova García, and López) (n=4); the latter 3 species combined accounted for 2% of the total. A subsample (n=15) of specimens morphologically identified as *An. albitarsis* s.l. was confirmed as *An. albitarsis* F (n=5), using molecular markers (Brochero *et al.* 2007, Ruiz *et al.* 2012

Biting activity and human biting rate: All species collected displayed biting activity both indoors and outdoors. *Anopheles darlingi* had 2 indoor peaks of 1900–2100 h and 0000–0100 h, and the greatest overall HBR (5.2 b/p/n). For this species, the average biting rate was 6 b/p/n with values ranging from 1–20.6 indoors and 1.7–72.6 outdoors. *Anopheles albitarsis* s.l. was caught mainly outdoors from 1800–1900 h. The HBR was 1.1 b/p/n with an average of 1 b/p/n, ranging from 1–3.2 b/p/n indoors and 1.0–6.3 b/p/n outdoors.

We analyzed the patterns of biting activity of *An. darlingi* and *An. albitarsis* s.l. according to human activities when people were likely exposed to biting: the 1st period (P1) between 1800–2200 h, the 2nd period (P2) between 2200–0300 h, and the 3rd period (P3) between 0300–0600 h (Figs. 2 and 3), For all patterns, the percentage of relative biting contribution per species was expressed as frequency of HBR per species for the total sampled. Natural infectivity status *Anopheles darlingi* from AB was naturally infected with *P. vivax* VK 210, representing an infection rate of 0.119% (1/840). The infected EO specimen was caught indoors between 1200 and 0100 h. No specimens were ELISA-positive for *P. falciparum*. The annual EIR was 2.6 infective bites/person/year (b/p/y) (6 3 0.00119 3 365).

Table 1 *Anopheles* species composition in two localities of San José del Guaviare- Amazonia, Colombia, 2010.

Locality	Month	<i>Anopheles</i> collected (n)	<i>Anopheles</i> species	
Agua Bonita	February	2	<i>An. darlingi</i>	
		2	<i>An. albitarsis</i> s.l.	
	May	26	<i>Anopheles</i> spp. ¹	
		6	<i>An. darlingi</i> ²	
			<i>An. albitarsis</i> s.l.	
			<i>Anopheles</i> spp. ¹	
El Progreso	June	8	<i>An. darlingi</i>	
		1	<i>An. albitarsis</i> s.l.	
	August	560	<i>Anopheles</i> spp. ¹	
		9	<i>An. darlingi</i>	
		5	<i>An. oswaldoi</i> s.l.	
		3	<i>An. albitarsis</i> s.l.	
		1	<i>An. rangeli</i>	
		13	<i>An. braziliensis</i>	
			<i>Anopheles</i> spp. ¹	
		September	128	<i>An. darlingi</i>
			3	<i>An. albitarsis</i> s.l.
			1	<i>An. oswaldoi</i> s.l.
	October	3	<i>Anopheles</i> spp. ¹	
		112	<i>An. darlingi</i>	
		5	<i>An. albitarsis</i> s.l.	
		3	<i>An. braziliensis</i>	
		4	<i>Anopheles</i> spp. ¹	
	November	8	<i>An. albitarsis</i> s.l.	
2		<i>An. darlingi</i>		
4		<i>Anopheles</i> spp. ¹		
December	57	<i>An. albitarsis</i> s.l.		
	35	<i>An. braziliensis</i>		
	2	<i>An. darlingi</i>		
	1	<i>An. rangeli</i>		
	5	<i>Anopheles</i> spp. ¹		

¹ *Anopheles* spp. unidentifiable specimens due to loss of taxonomic characters.

² One specimen of *An. darlingi* infected with *Plasmodium vivax* 210.

Discussion

Malaria transmission in San José del Guaviare is mainly caused by *P. vivax* (API 5 17.53 in 2010), and *An. darlingi* was found naturally infected by *P. vivax* VK-210. Similarly to other localities in Brazil and the southeastern Amazon, this species exhibited biting activity both indoors and outdoors throughout the night, with a biting peak at sunset (P1), a gradual decrease in biting activity until midnight, and a 2nd peak at 0300 h and 0400 h (P3), consistent with local human activities (Charlwood 1996, Da Silva-Vasconcelos *et al.* 2002, Voorham 2002). In general, in San José del Guaviare, the risk of contracting malaria is likely highest before 2200 h, when vectors are most active (Voorham 2002, Jiménez *et al.* 2012, Ahumada *et al.* 2013). However, in agreement EQ with Charlwood's (1996) observation that gravid females bite after midnight, in the present study, *An. darlingi* collected between 1200 and 0100 h was infected by *P. vivax*. Malaria control in San José del Guaviare should consider multiple strategies; for example, long-lasting insecticidal nets to reduce human–vector contact when people are most exposed and unprotected, and the use of repellants or other alternative controls around sunset, when the HBR is high and the human population is active.

According to the EIR, in San José del Guaviare 1 person could be exposed to 2.6 infective bites for *An. darlingi* per year, similar to results in the Orinoquia and Amazonian regions in Colombia, as well as in Venezuela and Brazil (Soares *et al.* 2003, Magris *et al.* 2007, Girod *et al.* 2008, ER Jiménez *et al.* 2012, Ahumada *et al.* 2013). In forested areas in Peru, the EIR for *An. darlingi* was 0.1 infective b/p/y, whereas in more deforested areas (e.g., grass, croplands), the EIR corresponded to 38 infective b/p/y (Vittor *et al.* 2006). A new study investigating riverine sites frequented by occupational laborers north of Iquitos, Peru, detected up to 5.3 infective b/p/n for *An. darlingi* (Parker *et al.* 2013). Economic activities in San José del Guaviare related to the establishment of fishponds and pastures for livestock generate deforestation in rural areas that is conducive to an increase in *Anopheles* breeding sites, reduced refuge niches for vectors, and, ultimately promote malaria outbreaks (Padilla *et al.* 2011).

Historically, entomological studies have reported *An. darlingi* and *An. albitarsis* s.l. in sympatry in the Orinoquia and Amazonia regions in Colombia (González and Carrejo 2009, Jiménez *et al.* 2012, Ruiz *et al.* 2012). Several members of the Albitarsis Complex have been involved in malaria transmission (Conn *et al.* 2002, Povoá *et al.* 2006, Jiménez *et al.* 2012, Ruiz *et al.* 2012).

In San José del Guaviare, *An. albitarsis* s.l. was much less abundant than *An. darlingi*, exhibiting a biting activity both indoors and outdoors, with a peak at sunset (P1) between 1800–2000 h (Fig. 3) and a HBR of 2 b/p/n. None of the Albitarsis Complex specimens, nor the *An. albitarsis* F identified (n= 5) were infected with Plasmodium and the importance of this species in malaria epidemiology is unknown (Ruiz *et al.* 2012). *Anopheles braziliensis* has been traditionally considered zoophilic (Faran and Linthicum 1981) and it is not often reported naturally infected with Plasmodium (but see Da Silva-Vasconcelos *et al.* 2002, Martins-Campo *et al.* 2012). In the present EV study, *An. braziliensis* was less abundant but showed anthropophilic behavior and was active outdoors, mainly between 1900–2100 h. *Anopheles oswaldoi* s.l. and *An. rangeli* were both collected outdoors between 2000–2200 h (P1). These species were not found infected and, because of low abundance in this study, it was not possible to determine their biting patterns.

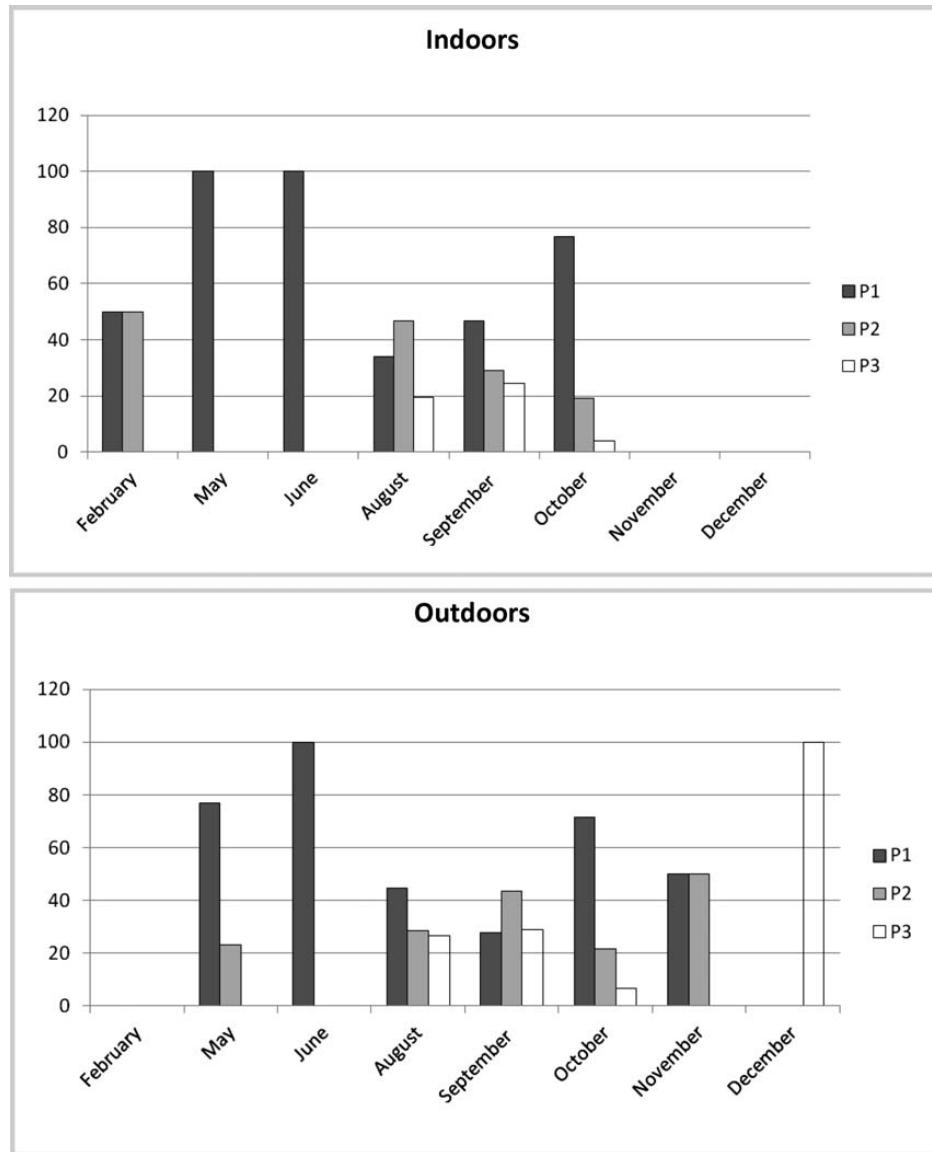


Figure 2 Variation in percentage contribution of *An. darlingi* biting activity for three periods of the night

Seven species reported for San José del Guaviare previously *An. apicimacula* Dyar and Knab; *An. forattinni* Wilkeron and Sallum; *An. costai* Fonseca and Ramos; *An. mattogrossensis* Lutz and Neiva; *An. neomaculipalpus* Curry; *An. pseudopuctipennis* Theobald; *An. punctimacula* Dyar and Knab; and *An. triannulatus* Neiva and Pinto (González and Carrejo 2009) were not detected. The reduced diversity of *Anopheles* species in these 2 sites compared with previous reports may have resulted from 1) differences in the sites and seasonality sampled, 2) discontinuous collections and number of collections, and 3) local changes in ecological conditions and human activities (Conn *et al.* 2002, Yasuoka and Levins 2007, Dantur *et al.* 2009).

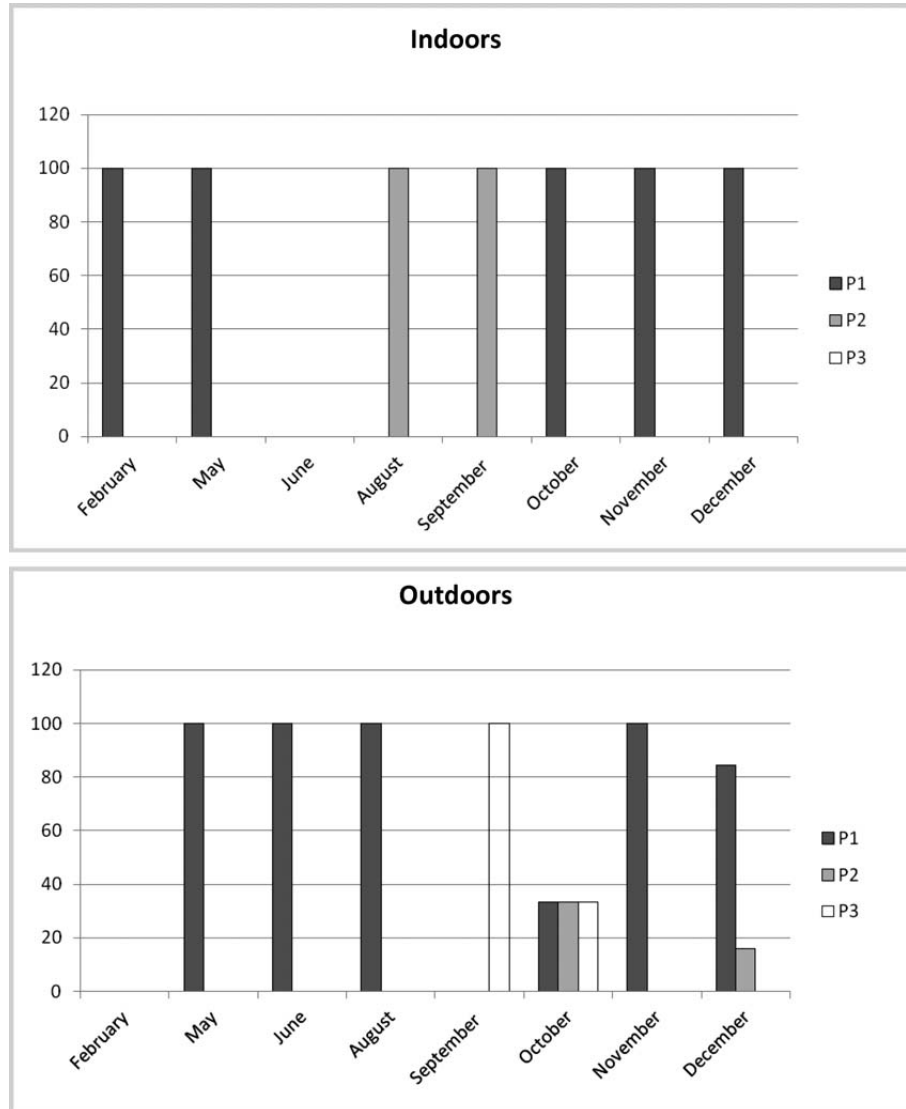


Figure 3 Variation in percentage contribution of *An. albitarsis* s.l. biting activity for three periods of the night

According to the distribution of malaria cases during 2010 in San José del Guaviare, it was not possible to establish any association between the abundance of adult *Anopheles* species and monthly incidence of malaria; several studies have shown the infection rate for Colombian *Anopheles* species to be low, but still adequate to maintain malaria transmission in endemic areas (Lanelli *et al.* 1998, Tadei *et al.* 1998, Conn *et al.* 2002, WHO 2008). Despite the relatively low capture rates, our study incriminated *An. darlingi* as the most likely principal malaria vector in this municipality. Vector control measures are conducted by Department of Health Authorities in endemic rural and urban municipalities of Guaviare. Administrative, social, and technical difficulties reduce the effectiveness of malaria programs to control malaria transmission (unpublished observations). These include: sociocultural characteristics of the indigenous and rural populations that contribute to floating communities moving back and forth from high malaria transmission areas to urban areas; very difficult road access; inadequate housing and limited access to

public services and health care; unlimited breeding sites of *An. darlingi* from flooded rivers during the rainy season (April to November); and environmental degradation from slash-and-burn agriculture and livestock, resulting in drastic changes in the ecosystem.

In conclusion, malaria control strategies in San José del Guaviare should be multifaceted and consider social, environmental, technical, and administrative issues through strengthening of epidemiological, clinical, and entomological surveillance.

Some possible prevention and control strategies include: 1) accurate diagnosis and adequate treatment for patients; 2) evaluation of response to treatment to detect drug resistance; 3) surveillance of asymptomatic people arriving from high transmission zones to peri-urban and urban areas; 4) strengthening of epidemiological notification; 5) improved entomological surveillance to determine, monitor, and evaluate peak anopheline biting activities for variation and plasticity of seasonal and temporal change, particularly in relation to ecosystem transformations that can dramatically increase malaria transmission (Vittor *et al.* 2006, Gil *et al.* 2007, Moreno *et al.* 2007).

Acknowledgments:

The authors thank Humberto Mosquera for assistance with field collections.

We thank Maria Camila Ramirez for assistance with the map (Figure 1).

We thank Laureano Mosquera, Entomological Unit Coordinator, and the technical personnel the Guaviare Health Department, Colombia, for logistic support in San José del Guaviare.

We are grateful to Robert A. Wirtz, Centers for Disease Control (CDC), Entomology Branch, Atlanta, Georgia, USA, for ELISA reagents.

Financial support

This work was supported by National Institutes of Health, USA grant 2R01AIO54139. Malaria Vector Biology in Brazil: Genetics and Ecology to JEC, Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, Faculty of Agronomy Quipu 201010012197 to HB, and Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS Jóvenes Investigadores e Innovadores -“Virginia Gutiérrez de Pineda” – 2010 to IPJ

References

- 1) **Ahumada ML, Pareja PX, Buitrago LS, Quiñones ML.**, 2013. Comportamiento de picadura de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) y su asociación con la transmisión de malaria en Villavicencio (Meta, Colombia). *Biomédica* 33 (2). Online: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1492/1622>
- 2) **Beier JC, Asiago CM, Onyango FK, Gargan TP, Wirtz RA, Koech DK, Roberts CR.** 1988. **ELISA absorbance cut-off method affects malaria sporozoite rate determination in wild Afrotropical *Anopheles*.** *Med Vet Entomol* 2, 259-64.
- 3) **Brochero, H. L., C. Li, and R. C. Wilkerson.** 2007. A newly recognized species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) Albitarsis Complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 1113-17.
- 4) **Brochero H, Quiñones L.**, 2008., Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. *Biomédica*. 28:18-24.
- 5) **Cienfuegos, A.V., Gómez, G.F., Córdoba, L.A., Luckhart, S., Conn, J.E., Correa, M.M.**, 2008. Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Biomédica* 19: 35-44.
- 6) **Conn, J., Wilkerson, R., Segura, N., De Souza, R., Schlichting, C., Wirtz, R., Póvoa, M.**, 2002. Emergence of a new Neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 18-22.
- 7) **Charlwood, J.D.**, 1996. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 391-8.
- 8) **Da Silva-Vasconcelos, A., Kato, M.Y., Mourão, E.N., De Souza, R.T., Lacerda, R.N., Sibajev, A., Tsouris, P., Pova, M.M., Momen, H., Rosa-Freitas, M.G.**, 2002. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 151-161.
- 9) **Dantur Juri MJ, Zaidenberg M, Claps GL, Santana M, Almiron WR** 2009. Malaria transmission in two localities in Northwestern Argentina. *Malar J* 8: 18.
- 10) **Estrada DA, Quiñones ML, Sierra DM, Calle DA, Ruiz F, Erazo HF, et al.**, 2003., utilidad de la morfología de los huevos como método indirecto para identificar *An. benarrochi*, *An. oswaldoi*, y *An. rangeli* en Putumayo, Colombia. *Biomédica* 23: 388-95.
- 11) **Faran M., Linthicum, L.**, 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Sys.* 13: 1-81.
- 12) **Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R.**, 1994., DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome c Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-9.
- 13) **Gil LH, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PE, Silva LH.**, 2007. Urban and suburban malaria in Rondonia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 271-6.

- 14) **Girod, R., Gaborit, P., Carinci, R., Issaly, J., Fouque, F.,** 2008. Anopheles darlingi bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103: 702–710.
- 15) **González, R., Carrejo, N.,** 2009. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución, 2nd ed. Universidad del Valle. 260 pp.
- 16) **Herrera, S., Suarez, M., Sanchez, G., Quiñones, M., Herrera, M.,** 1987. Uso de la técnica inmuno-radiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoitos de *Plasmodium*. *Colombia Med.* 18, 2–6.
- 17) **IGAC** - Instituto Geográfico Agustín Codazzi 2002. Atlas de Colombia. Publicación Institucional, Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá, 342 pp.
- 18) **Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI** 1999. Guaviare Población y Territorio, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, (Colombia) 190 pp.
- 19) **Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.** [homepage on the internet]. Guaviare: Proyecto Investigación Científica en Ecosistemas y Recursos Naturales de la Amazonia Colombiana. [up dated 2000 Aug 8; cited 2013 Jun 17]. Available from: <http://www.sinchi.org.co>.
- 20) **Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales- IDEAM.** 2010. Colombia: Primera Comunicación Nacional ante la convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Bogotá (Colombia). 303 p.
- 21) **Instituto Nacional de Salud - INS,** 2011. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica N°52. Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Dic. 26 de 2010 – Enero 1 de 2010, 9 pp. [up dated 2011 Jan 10; cited 2013 Jun 17]. Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico>.
- 22) **Jiménez P, Conn J, Witz R, Brochero H.,** 2012 *Anopheles* (Diptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia. *Biomédica.* 32 (Supl. 1):13-21.
- 23) **Lanelli HV, Honorio NA, Lima DC, Loureco-De- Oliveira R, Santos RV, Coimbra Junior CE.** 1998. Faunal composition and behavior of anopheline mosquitoes in the Xavante Indian Reservation of Pimentel Barbosa Central Brazil. *Parasite* 5:197-202.
- 24) **MacDonald, G.,** 1957. The Epidemiology and Control of Malaria. Oxford University Press, Oxford.
- 25) **Magris, M., Rubio-Palis, Y., Menares, C., Villegas, L.,** 2007. Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 303–11.
- 26) **Martins-Campo** 2012. Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. *Mal Journal* 11: 351.
- 27) **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderon GI, Quiñones ML, Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, et al.,** 2011. Malaria vector species in Colombia – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(Supl.1):223-38.

- 28) **Moreno JE, Rubio-Palis Y, Páez E, Pérez E, Sánchez V.**, 2007. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. *Med Vet Entomol.* 21: 339-49.
- 29) **Padilla J, Peña S.** Situación epidemiológica de la malaria en Colombia. 2002. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 333-45.
- 30) **Padilla JC, Álvarez G, Montoya R, Chaparro P, Herrera S.**, 2011. Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106: 114-22.
- 31) **Parker BS**, et al. 2013. Hyperendemic malaria transmission in areas of occupation-related travel in the Peruvian Amazon. *M. Journal* 12: 178.
- 32) **Rubio-Palis, Y., Zimmerman, R.**, 1997. Ecoregional classification of malaria vectors in the Neotropics. *J. Med. Entomol.* 34, 499–510.
- 33) **Ruiz F, Linton YM, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Quinones ML, Velez ID, Wilkerson RC.**, 2010. Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105; 899-903.
- 34) **Ruiz F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quinones ML, Pova MM, Linton YM.**, 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors*: 5-44.
- 35) **Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM)** 1957. Plan para la erradicación de la malaria en Colombia, República de Colombia. Ministerio de Salud Pública y Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, Vol II, Bogotá, 635 pp.
- 36) **Soares Gil LH, Alves FP, Zieler H, Salcedo JMV, Durlacher RR, Cunha RP**, 2003. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. *J Med Entomol* 40: 636–641.
- 37) **Tadei, W.P., Thatcher, B.D., Santos, J.M., Scarpassa, V.M., Rodrigues, I.B., Rafael, M.S.**, 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 325–35.
- 38) **Vittor, A.Y., Gilman, R.H., Tielsch, J., Glass, G., Shields, T., Lozano, W.S., Pinedo- Cancino, V., Patz, J.A.**, 2006. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 3–11.
- 39) **Voorham, J.**, 2002. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. *Rev. Saude Publica* 36: 75–80.
- 40) **World Health Organization.** 1975. Manual of Practical entomology in malaria. Vol. II. Methods and techniques. Geneva: WHO; pg 13.
- 41) **Wirtz, R.A., Zavala, F., Charoenvit, Y., Campbell, G., Burkot, T., Scheneider, I., Esser, K., Beudoin, R., Andre, R.**, 1987a. Comparative testing of *Plasmodium falciparum* sporozoite monoclonal antibodies for ELISA development. *Bull World Health Organ.* 65, 39–45.
- 42) **Wirtz, R.A., Burkot, T.R., Graves, P.M., Andre, R.G.**, 1987b. Field evaluation of enzymelinked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium*

- vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J. Med. Entomol.* 24, 433–37.
- 43) **Wirtz, R.A., Charoenvit, Y., Burkot, T.R., Esser, K.M., Beaudoin, R.L., Collins, W.E., Andre, R.G.**, 1991. Evaluation of monoclonal antibodies against *Plasmodium vivax* sporozoites for ELISA development. *Med. Vet. Entomol.* 5: 17–22.
- 44) **Wirtz, R.A., Sattabongkot, J., Hall, T., Burkot, T.R., Rosenberg, R.**, 1992. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Plasmodium vivax*-VK247 sporozoites. *J. Med. Entomol.* 29, 854–857.
- 45) **Yasuoka J, Levins R** 2007. Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 76: 450-60.
- 46) **Zapata, M.A., Cienfuegos, A.V., Quiros, O.I., Quinones, M.L., Luckhart, S., Correa, M.M.**, 2007. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Uraba, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of ITS sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 67–72.

2.2 *Anopheles* breeding sites in San José del Guaviare Amazonia- Colombia

Irene P. Jiménez^I Jan E. Conn^{II-IV} Helena Brochero^I

- I. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia
- II. Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY 12159, USA
- III. Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State University of New York at Albany, Albany, NY 12222, USA

Abstract

Between February and December 2010, anopheline breeding habitats were identified and characterized in rural and peri-urban area in San José del Guaviare municipality, Amazonas - Orinoquia region, in southeast Colombia. Immature forms were collected from four types of breeding sites: Fish ponds in use (n=17), abandoned fish ponds (n=9), flooded quarry (n=2), wetland (n=1) and stream (n=1). The taxonomic identification was based on entomological series. A total of 432 anopheline were determined belonging to 4 species: *Anopheles albitarsis* s.l. (64%), *An. braziliensis* (17.5%), and *An. oswaldoi* (2.5%) *The presence An. albitarsis* F was determined based on amplification of mtDNA - COI. *An. albitarsis* s.l. were found throughout the year with preference by human made breeding sites, and *An. darlingi* was collected in natural breeding sites,

Key words: *Anopheles*, malaria, breeding sites, Amazonia Colombia

Introduction

Malaria is one of major public health problem in Colombia, but has been considered a predominantly rural disease, primarily because suitable *Anopheles* mosquito breeding sites are few in populated urban areas (Padilla *et al.*, 2011). Malaria transmission depends on a number of environmental factors (temperature, precipitation, humidity,) that affects the vector survival. Every *Anopheles* species has its preferred water bodies for oviposition, depending on climate, physical geography and human activities (Stain *et al.*, 2011). Breeding sites can be natural or man-made, of various sizes, located in running or stagnant waters, shaded or sunny, permanent or temporary that affects the development of anopheline larvae (Rubio – Palis *et al.*, 2005).

The topography of Guaviare department is lowlands, located in the transition between Orinoquia and Amazonia regions of southeast Colombia (0°32' to 3°09' N; 69°47' to 73°47' W), and has an area of 42.327 km². The malaria is due to *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti), *P. falciparum* (Welsh) and mixed infections by *P. falciparum*/*P.vivax*. (INS 2011). San José del Guaviare is the capital city from Guaviare department where malaria is endemic, and each year registers one of the highest average annual parasite malaria index (API) in Colombia. (INS, 2011). Initial efforts to describe *Anopheles* species distribution in Colombia determined that *An. darlingi*, Root 1926 is a primary vector in Guaviare (SEM, 1957, Olano *et al.* 2001, Montoya-Lerma *et al.*, 2011). In San José del Guaviare municipality, rural and periurban malaria transmission is aided by immigration of infected humans from areas with high malaria transmission and enhanced by intensive land use that contribute to abundant *Anopheles* breeding sites (Padilla *et al.*, 2011).

Knowledge of spatial and temporary distribution and main characteristics of mosquito breeding sites is a key element for implementing efficient and effective immature control measures. This work was carried out in the rural and peri-urban area of San José del Guaviare in order to collect baseline information for larval breeding sites and characterize the occurrence (presence or absence) of anofeline species to suggest strategies for monitoring and implementation of strategies to reduce the vector population.

Materials & Methods

Study site - *Anopheles* immature forms were collected in three localities in rural and peri-urban area from San José del Guaviare Municipality: Agua Bonita- AB (N 02°34'43.8" - O 72°37'31,6") El Progreso - EP (02°32'17.4"N - 72°39'31.3"O) and El remanso ER (N 02°34'43.8" - O 72°37'31,6"). San José del Guaviare is defined as lowland forest ecoregion (Rubio-Palis and Zimmerman 1997) and is located at 180 meters, with a mean annual precipitation of 2800mm (rainy season April to November; dry season December to March), mean temperature up to 26,5°C, and relative humidity > 80% (IDEAM, 2010). This area is characterized by environmental degradation, due to urbanization, proliferation and intensification of illicit crops and palm plantations, fisheries and pastures for livestock. The study area is dotted with swamps, fishponds and many additional water bodies are created for agricultural purposes; these combined with the hot and humid climate, results in suitable breeding opportunities for *Anopheles sp.* mosquitoes. Because the rural area from San José de Guaviare is affected by armed conflict, entomological collection was carried out taking into account the accessibility to the study area, and confirmation of local security for field staff. (Figure 2-4

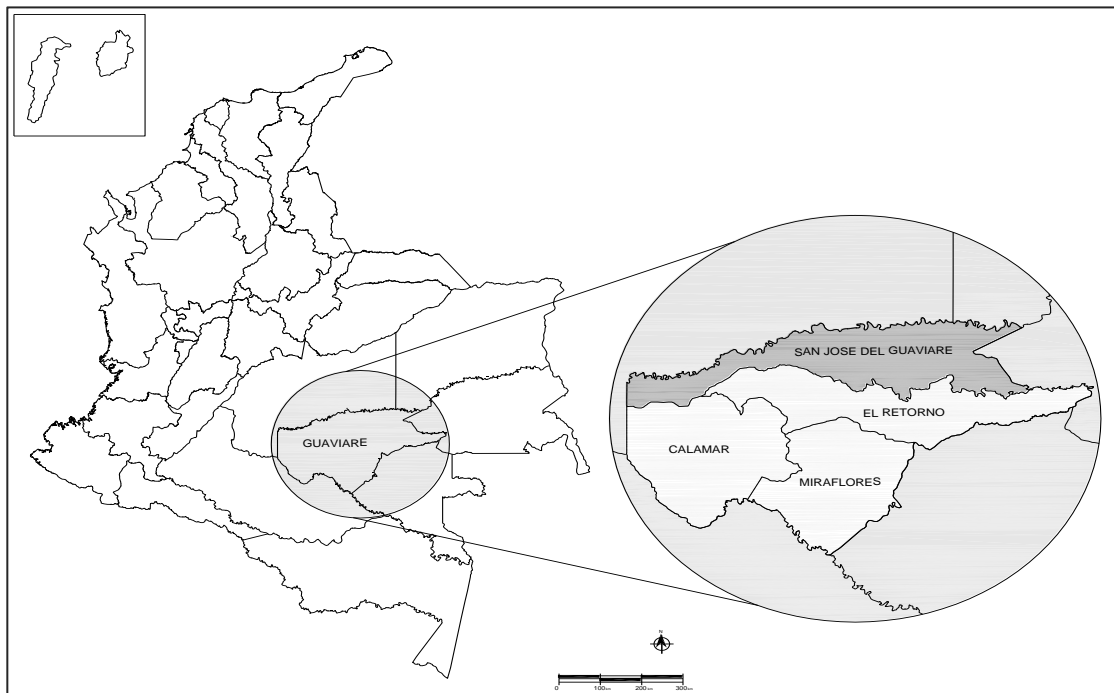


Figure. 1 Map of Colombia with the Department of Guaviare enlarged showing the municipalities

Larval sampling- According to entomological surveillance system of The Secretary of Health of San José del Guaviare, *anopheline* larvae were collected from 30 breeding sites located in rural and peri-urban area. (Figure 2-5) Sampling on larval habitat was carried out during eight months, eight times for each larval site. Breeding sites were inspected to identify and collect immature forms of *Anopheles*, using standard dipper (500 ml) every 5 m by 20 ladlefuls counting the number of individuals collected on each dive covering the entire of breeding place (Service 1975). At each site, temporality (permanent, temporal), sun exposure (full shade, partial or none), approximate size (m², km²), distance nearest dwelling, type of vegetation (emergent, floating or submerged) and depth, were registered. A breeding place was considered temporary when it was found to be dry at least once during the follow-up or during one field visit in dry season. Otherwise, it was recorded as permanent. Sites where no *Anopheles* larvae could be found in 10 dips were recorded as negative.

In order to obtain entomological series, immature forms were placed in plastic tubes with the same breeding site water source, these were labeled with the code assigned to each breeding site and transported live to the Entomology Laboratory of the Faculty of Agriculture at the Universidad Nacional de Colombia in Bogotá. Because both larvae and pupae were collected, an entomologic series corresponded to the complete exuvia from fourth instar larvae, pupa exuvia and adult emerged, while an incomplete series had exuvia pupae and adult emerged (Belkin *et al.*, 1967)

Mosquito identification- Adult mosquitoes and larva IV instar/pupal exuviae from entomological series were identified based on morphological features (Gonzalez and Carrejo 2009). For members of the Albitarsis Complex taxonomic identification was confirmed using molecular analysis based on the mtDNA barcode region sequences (Folmer *et al.*, 1994; Ruiz *et al.*, 2010). Genomic DNA was obtained from the abdomen of each specimen (Zapata *et al.* 2007; Cienfuegos *et al.*, 2008) using DNAeasy tissue kits (Qiagen, CA, USA).

Data Analysis All these variables were determined each month on larval sampling. Habitat types of all bodies of water were categorized according to general characteristics observed. Interactions between *Anopheles spp.* and their breeding sites were plotted using the functions plotweb and visweb found on the R (R Development Core Team, 2011) package bipartite (Dormann *et.al.* 2009). Correspondence Analyses (CA) were carried out to assess the association between *Anopheles* species and types of breeding sites that they inhabit. CAs were obtained using the package vegan (Oksanen, *et al.*, 2011) for the R software environment for statistical computing and graphics (R Development Core Team, 2011).

Ethics This study did not involve human subjects and permission was obtained procedures that were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the National University of Colombia and by the Institutional Review Board at New York State Department of Health. No additional ethical clearance was necessary.

Results

Larval sampling A total of 29 potential mosquito breeding sites were examined and mapped, among which 26 (89.6%) were positive for *Anopheles* in immature stages (*i.e.*, larvae or pupae); 9 (31%) were temporary (abandoned fish ponds) and 20 (68.9%) were

permanent (fish ponds, stream, wetland, flooded quarry) (Table 2-1). According to CA the number of entomological series obtained by specie was associated to characteristics observed in each type of breeding sites. As permanent and natural breeding sites were registered: 1) Stream with slow water flow that may increase according to the intensity of rainfall on wet season causing localized flooding. The immature forms were located in shaded areas with surrounding herbaceous and shrub vegetation; 2) Wetland was characterized by abundant organic matter, with surrounding and floating vegetation, and shaded areas. In both types of these breeding the most abundant species was *An. darlingi*.

Table. 1 Frequency of anopheline per type and per locality in San José del Guaviare municipality, Amazonia, Colombia 2010

Locality	Breeding sites		n	species	
	N	Types			
Agua Bonita(AG) N 02°34'43.8"- O 72°37'31.6"	11	Fish ponds	149	<i>An. albitarsis</i> s.l	
			24	<i>An. braziliensis</i>	
			10	<i>An. darlingi</i>	
Rural Area	2	Flooded Quarry	9	<i>An. albitarsis</i> s.l	
			16	<i>An. braziliensis</i>	
		1	Stream	10	<i>An. darlingi</i>
				1	<i>An. oswaldoi</i> s.l
1	Wet land	7	<i>An. darlingi</i>		
		2	<i>An. oswaldoi</i> s.l		
El Progreso - (EP) N 02°32'17.4" - O 72°39'31.3"	2	Fish ponds	12	<i>An. braziliensis</i>	
			5	<i>An. albitarsis</i> s.l	
			2	<i>An. darlingi</i>	
			3	<i>An. oswaldoi</i> s.l	
El remanso (ER) N 02°34'43.8"- O 72°37'31.6")	6	Fish ponds	78	<i>An. albitarsis</i> s.l*	
			13	<i>An. braziliensis</i>	
			1	<i>An. darlingi</i>	
			3	<i>An. braziliensis</i>	
Peri - Urban area	7	Abandoned Fish ponds	51	<i>An. albitarsis</i> s.l	
			16	<i>An. braziliensis</i>	
			25	<i>An. darlingi</i>	
			2	<i>An. oswaldoi</i> s.l	

N= Number of breeding sites

n= Number of entomological series

* Three adults identified as *An. albitarsis* F

As human made breeding sites were found: 1) Fish ponds defined as excavated soil that is artificially flooded with river water in order to generate growing fish under controlled conditions. These are always close to houses characterized by having different sizes with clear or turbid water, permanently exposed to sunlight and may or may not have surrounding, floating and emergent aquatic vegetation depending on maintenance owners. Some of these were abandoned, with turbid water in the presence of fallen leaves, and abundant surrounding and emergent vegetation. *An. albitarsis* s.l. was the predominantly specie followed by *An. braziliensis* which was registered in abandoned fishponds. 2) Flooded quarry defined as wide area (>300 mts²) of open-pit mine from which rock or minerals are extracted. It is generally used for extracting building materials, riprap, sand, and gravel- In raining season quarry is flooded due to heavy rainfall and inadequate drainage. This is always exposed to direct sunlight, with surrounding, and floating vegetation. The predominant specie was *An. braziliensis* (Figure 2-6)

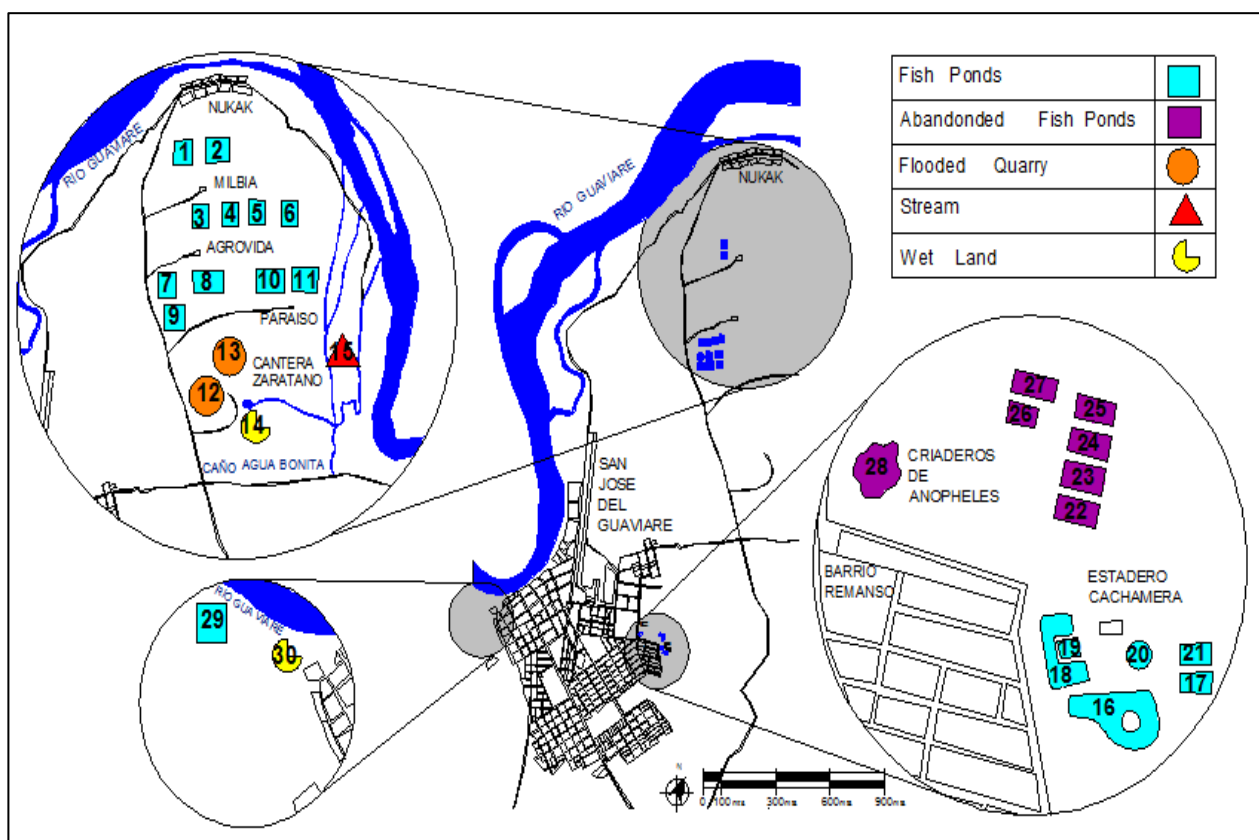


Figure. 2 Map of breeding sites sampling in urban and periurban area in San José del Guaviare, Colombia 2010

Specie composition A total of 883 anophelie larvae of different stages were collected in 29 breeding sites, only 441 were completed to entomological series used for taxonomic identification. Four *Anopheles* species belonging to the subgenus *Nyssorhynchus* were determined: *An. albitarsis* s.l. (n= 294), *An. braziliensis* (n=81), *An. darlingi* (n=54), and *An. oswaldoi* s.l. (n=12). (Table 2-2)

An. albitarsis s.l. was recorded during all sampling months and it was associated with permanent and human made breeding sites with direct exposure to sunlight. Some specimens determined as *An. albitarsis* s.l. (n=5) were confirmed as *An. albitarsis* F (n=3)

using molecular markers (Brochero *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2012). This is the first record of this specie in San José del Guaviare, Guaviare. *An. braziliensis* was found in natural and human made breeding sites being more frequent in fish ponds and flooded quarry. *An. darlingi* was associated with shaded and natural breeding sites as stream and wet lands but also this specie was collected in abandoned fishponds (Figure 2-6).. *An. oswaldoi* was present in stream and fishponds, but uncommon

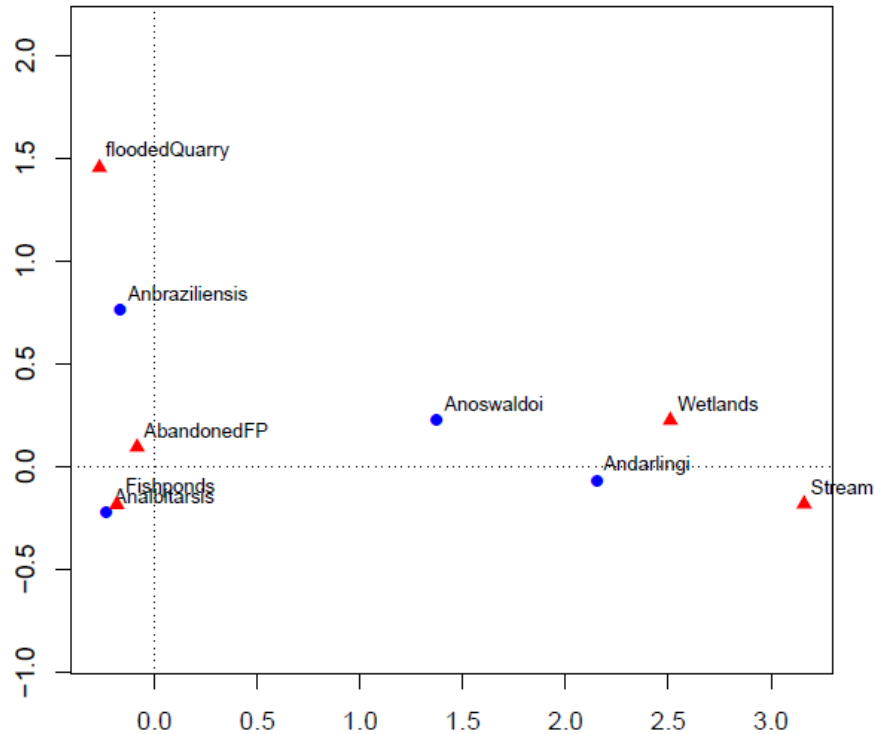


Figure. 3 Correspondence Analyses factor map *Anopheles* spp Vs breeding sites types
*temporal breeding site type; Abandoned FP=Abandoned fish ponds, *permanent breeding sites; Fish ponds, stream, flooded Quarry, Wet lands

Discussion

Inmature forms habitats and their physical and ecological characteristics contribute information about the distribution and abundance of mosquito populations (Forattini 1962) and contribute to define appropriate larval control strategies. Because San José del Guaviare is departmental capital, it receives floating human population throughout the year from areas with high malaria transmission; many indigenous groups are located in peri-urban areas and began their unplanning settlement. This results in housing made of wood and plastics which does not allow an adequate physical barrier to malaria vectors. People use extractive soil materials for construction of water storage tanks for consumption and domestic labor creating suitable breeding sites for anopheline. Moreover, in periurban and rural areas, land excavation to build fish ponds is a cultural issue because these represent an important income for the community. The proximity of these breeding sites to homes; dependence for maintenance by its owners; their permanence throughout the year and as suitable habitat for anopheline because fish farming do not

permit acute control of immature mosquito forms, fish ponds are consider as the most relevant focus for entomological surveillance in San José del Guaviare..

In general, excavations were the most abundant breeding sites and more favorable to the development of various *Anopheles* species, possibly because they are a permanent habitat with abundant vegetation that provides shelter and food for larvae (Hall, 1972; Merrit *et al.*, 1992). Control for immature forms should include sustainable community participation for filling abandoned excavations, proper management of water reservoirs, and clearing and removal of vegetation surrounding fish ponds allowing predation fish larvae. This could be encouraged through municipal programs that generate a plus for families to keep clean fish farms. Furthermore, when using biolarvicides densities immature mosquitoes are higher should be considered.

Periurban area in San Jose del Guaviare has reported autochtonous cases of malaria all year and the permanent anopheline breeding contribute to malaria outbreaks on vulnerable human population. Consistent with other studies, the most common species was *An. albitarsis* s.l showed preference for permanent and human made breeding sites with little depth and direct exposure to sunlight rays (Conn *et al.*, 2002; Sinka *et al.*, 2010; Mckee *et al.*, 2013). As opportunistic species, members of *Anopheles Albitaris* Complex could colonize several habitats near to dwellings, allowing the increase of adults abundance even above the primary vectors as *An. darlingi*, leading to changes in the dynamics of local transmission malaria, a phenomenon that has been observed in forest ecosystems with intensive interventions. (Conn *et al.*, 2002). Because *An. albitarsis* s.l was found infected by *Plasmodium falciparum* in other municipality of Orinoquia region showing an entomological inoculation rates of 5.1 (Jiménez *et al.*, 2012) entomological surveillance should be intensified for this species complex in order to perform long-term studies to determine complex members and define biology characteristics, seasonality, dynamics of human intervention processes and their role in the malaria transmission.

Historically *An. darling* has been considered as the primary vector in San José del Guaviare, (SEM,1957; González & Carrejo, 2009), and it has always been associated with natural breeding sites (Deane *et al.*, 1948; Forattini *et al.*, 1962; Rozendaal, 1992; Hiwat & Bretas, 2011; Olano *et al.*, 2002, Montoya-Lerma *et al.*, 2011). This study revealed that *An. darlingi* occupies a wide variety of natural habitats,preferentially in large, deep, clear and uncontaminated water collections partially protected from direct sunlight. Although this species can adapt to human made breeding sites near to homes, in San José del Guaviare adult mosquitoes are coming from of breeding sites located in forest areas not include in our study. Several studies have found that changes in the relative abundance of *An. darlingi* depend not only on precipitation but respond to interactions between the availability of breeding sites, the level of rivers and environmental variables determining seasonal and temporary fluctuations in density population (Charlwood, 1996; Hiwat and Bretas 2011; Montoya-Lerma *et al.*, 2011). Low frequency of immature forms for *An. darlingi* could be explained by the types of breeding sites visited (mainly manmade) exposed totally to sunlight. Due the difficulty in accurately locating *An. darlingi* breeding sites, associated with the dimension of bodies of water in the Amazon and Orinoquia regions does not favor the use of biological larvicides, control strategies should be focus on adult forms.

The rainfall regime in the Orinoco region is characterized by eight months for rainy season and four for dry season. This study failed to determine seasonal patterns for *Anopheles* species in San José del Guaviare because only one month for dry season was

sampled. . However, *An. albitarsis* s.l was collected during all sampling time and this specie was more frequent in August, just a month after peak rain when breeding sites as fish ponds stabilize. This species had less frequent in May when high rainfall values were registered (Data not shown). *An. darlingi* was more frequent in August and less frequent in May may be this species colonizes water collections generated at the beginning of the rains, but immature forms can be washed when they are intensified.

An. braziliensis was found in a wide natural and human made breeding sites, which together with records of natural infection with parasites of the genus *Plasmodium* in some areas of the Amazon (Deane *et al.*, 1948), It involves a careful entomological surveillance for this species in San José del Guaviare.

Departmental Health Secretary of Guaviare has defined biolarvicides (*Bacillus sphaericus*) for anopheline larval control in peri-urban and urban areas when the number of breeding sites is limited. However, the *B. sphaericus* used on water bodies without physicochemical and biotic factors characterization (water temperature, pH, exposure to sunlight, etc.) affect their effectiveness. Because *B. sphaericus* require application by technicians that need traveling to rural and peri urban areas ((Osborn *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008); it has registered anopheline physiological resistance (OMS 1992) and, Colombia has not approved other biolarvicides, malaria control should be focused to implement ITNs in all houses after considering local attitudes, beliefs and practices of the community, and use the results to evaluate changes in abundance or behavior of *Anopheles* species.

Acknowledgments

The authors thank Humberto Mosquera for assistance with field collections.

We thank Maria Camila Ramirez for assistance with the map (Figure 2-1).

We thank Laureano Mosquera, Entomological Unit Coordinator, and the technical personnel the Guaviare Health Department, Colombia, for logistic support in San José del Guaviare.

Financial support

This work was supported by National Institutes of Health, USA grant 2R01AI054139. Malaria Vector Biology in Brazil: Genetics and Ecology to JEC, Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, Faculty of Agronomy Quipu 201010012197 to HB, and Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS Jóvenes Investigadores e Innovadores -“Virginia Gutiérrez de Pineda” – 2010 to IPJ

Figure 3: Correspondence Analyses factor map; *Anopheles* spp. VS breeding sites types.*temporal breeding site type; Abandoned FP = Abandoned fish ponds, * permanent breeding sites: Fish ponds, stream, flooded Quarry, Wet lands.

References

- 1) **Belkin J, Schick R, Galindo P, Aitken T.** Estudios sobre mosquitos (Diptera: Culicidae). Ia. Un proyecto para un estudio sistemático de los mosquitos de Mesoamérica. Ila. Métodos para coleccionar, criar y preservar mosquitos. *Contrib Am Entomol Inst* 1967;1:163-80
- 2) **Brochero, H. L., C. Li, and R. C. Wilkerson. 2007.** A newly recognized species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *Albitarsis* Complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 1113-17.
- 3) **Charlwood, J.D., 1996.** Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 391–8.
- 4) **Cienfuegos, A.V., Gómez, G.F., Córdoba, L.A., Luckhart, S., Conn, J.E., Correa, M.M., 2008.** Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR–RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Biomédica* 19: 35–44.
- 5) **Conn, J., Wilkerson, R., Segura, N., De Souza, R., Schlichting, C., Wirtz, R., Povoá, M., 2002.** Emergence of a new Neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 18–22.
- 6) **Deane LM, Causey OR, Deane MP.** Notas sobre a distribucao e a biología dos anofelinos das regions Nordeste e Amazonica do Brasil. *Braz Serv Espec Saúde Pública Rev.* 1948; 827-965
- 7) **Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R., 1994.,** DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome c Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-9.
- 8) **Forattini OP:** Entomología médica, vol I. Parte Geral, Diptera, Anophelini. Sao Paulo, Faculdade de Higiene e Saude Publica Universidade de Sao Paulo; 1962.
- 9) **Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PE, Silva LH.** Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(3):271-6. DOI: 10.1590/S0074- 02762007005000013
- 10) **González, R., Carrejo, N., 2009.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución, 2nd ed. Universidad del Valle. 260 pp.
- 11) **Hall T F. 1972.** The influence of plants on anopheline mosquito breeding. *Am J Trop Med Hyg* 21:787-794.
- 12) **Hiwat H, Bretas G.** Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit Vectors.* 2011;4:177. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-177>
- 13) **Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales- IDEAM.** 2001. Colombia: Primera Comunicación Nacional ante la convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Bogotá (Colombia). 303 p.
- 14) **Instituto Nacional de Salud - INS,** 2011. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica N°52. Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Dic. 26 de 2010 – Enero 1 de 2010, 9 pp. [up dated 2011 Jan 10; cited 2013 Jun 17]. Available from:<http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico>
- 15) **McKeon, S., Schlichting, C., Povoá, M., & Conn, J.** (2013). Ecological suitability and spatial distribution of five anopheles species in amazonian Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 88(6): 1079-86
- 16) **Merritt RW, Dadd RH, Walker ED.** 1992. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Ann Rev Entomol* 37:349-376.

- 17) **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderon GI, Quiñones ML, Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, et al.** Malaria vector species in Colombia – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(Supl.1):223–38. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028>
- 18) **Olano V, Brochero H, Sáenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica.* 2001;21:402-3.
- 19) **Osborn F, Herrera M, Salazar A.** Eficacia del Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) como controlador biológico de larvas de *Anopheles aquasalis* Curry. *Bol Mal Salud Amb.* 2007;47(1):119-24.
- 20) **Padilla JC, Álvarez G, Montoya R, Chaparro P, Herrera S.,** 2011. Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106: 114-22.
- 21) **Rodrigues IB, Tadei WP, Santos RLC, Santos SO, Bagio JB.** Controle da malária: eficácia de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de espécies de *Anopheles* em criadouros artificiais-tanques de piscicultura e criadouros de olaria. *Rev Patol Trop.* 2008;37(2):161-77.
- 22) **Rozendaal JA:** Observations on the biology and behavior of anophelines in the Surinam rainforest. *Cah ORSTROM ser Ent Méd et Parasitol* 1987,15:33-43.
- 23) **Rubio-Palis Y, Menare C, Quinto A, Magris M, Amarista M** 2005. Caracterización de criaderos de anofelinos (Diptera: Culicidae) vectores de malaria del Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. *Entomotropica* 20: 29-38.
- 24) **Rubio-Palis, Y., Zimmerman, R.,** 1997. Ecoregional classification of malaria vectors in the Neotropics. *J. Med. Entomol.* 34, 499–510.
- 25) **Ruiz F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quinones ML, Povia MM, Linton YM.,** 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors:* 5-44.
- 26) **Servicio de Erradicacion de la Malaria (SEM)** 1957. Plan para la erradicación de la malaria en Colombia, República de Colombia. Ministerio de Salud Pública y Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, Vol II, Bogotá, 635 pp.
- 27) **Sinka EM ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI:** The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic Precis. *Parasites and Vectors* 2010, 3:72.
- 28) **Stein M, Luduena-Almeida F, Willener JA, Almiron WR,** 2011. Classification of immature mosquito species according to characteristics of the larval habitat in the subtropical province of Chaco, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 400--407.
- 29) **Zapata, M.A., Cienfuegos, A.V., Quiros, O.I., Quinones, M.L., Luckhart, S., Correa, M.M.,** 2007. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Uraba, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of ITS sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 67–72.

2.3 Anopheline malaria vectors in Miraflores, Guaviare Department, Amazonian Colombia

Irene P. Jiménez¹, Jan E. Conn^{2,3}, Helena Brochero¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia

²Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY 12159, USA

³Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State University of New York at Albany, Albany, NY 12222, USA

Sometido a Journal of Medical Entomology, Julio 2013.

Abstract

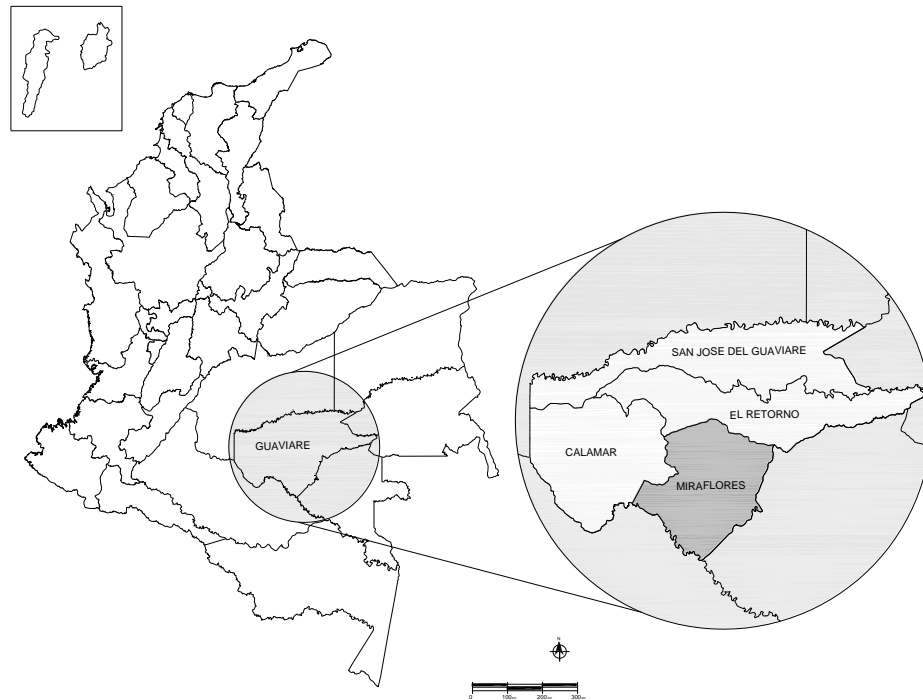
In the malaria endemic municipality of Miraflores in southeastern Amazonian Colombia, several aspects of the biology of local *Anopheles* species were investigated to supplement the limited entomological surveillance information available and to provide baseline data for malaria prevention and vector control. Anophelines were captured by human landing catch (HLC) indoors and outdoors between 18:00-06:00h during three consecutive nights for two months in March (dry season) and September (rainy season), in houses with reported malaria cases. Abundance, biting rate, and natural infection by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* VK247 and VK210 using ELISA were determined for each species. *Anopheles darlingi* was the most abundant species (95.6%), followed by *An. braziliensis* (3.6%) and *An. oswaldoi* s.l. (0.7%). During the dry season, exophagic activity was prevalent only between 18:00-21:00 h; after this (21:00-06:00h) only endophagy was encountered. In contrast, during the rainy season, both endophagy and exophagy occurred throughout the collection period. The Human Biting Rate (HBR) for *An. darlingi* was 8.6. This species was positive for *P. vivax* VK210 with a sporozoite rate (IF) = 0.13 (1/788). Breeding sites corresponded to stream (43.7%), flooded excavations (25%), flooded forest (12.5%), wetlands (12.5%) and an abandoned water reservoir (6.25%). *An. darlingi* predominated in these sites in both seasons. Based on these data, *An. darlingi* is the main local malaria vector and we recommend that prevention and control efforts focus on strengthening entomological surveillance to determine potential changes of species biting behavior and time, accurate *Plasmodium* diagnosis, adequate treatment for patients, and improved epidemiological notification.

KEY WORDS: *Anopheles darlingi*, malaria, Amazonia, Colombia

Introduction:

Colombia consistently reports the second highest annual malaria incidence in Latin America after Brazil (World Malaria Report 2011). Overall, in Colombia, *Plasmodium vivax* (Grassi and Feletti) is responsible for approximately 74% of malaria incidence, and *P. falciparum* (Welch) for the remaining 26%. More than 85% of Colombia's land area has the potential for endemic malaria transmission (Mendoza et al. 2000). The highest risk zones have been identified as the Pacific Coast, the Cauca River Valley, and the Urabá, Orinoquía, and Amazonia regions (Padilla and Peña 2002). The major malaria vectors in Colombia, all in subgenus *Nyssorhynchus*, are *An. darlingi* Root, 1926, *An. albimanus* Wiedemann, 1920, and *An. nuneztovari* Gabaldón, 1940 (Montoya-Lerma et al. 2011).

The Department of Guaviare is situated in the Amazonia region of eastern Colombia and has an area of 42,327 km². It extends from 0° 32' to 3° 09' N, and from 69° 47' to 73° 47' W (Fig. 2-7) and includes several municipalities, e.g., San José del Guaviare, El Retorno, Calamar and Miraflores (SINCHI 2000). According to the World Malaria Report (2011), this is a region of high transmission, with an API (Annual Parasite Index; number of malaria cases per 1000 inhabitants) of 10-50. Malaria is endemic in Guaviare, and during 2010 it had the highest API in Colombia (58.8; INS 2010). In 2010 the municipality of Miraflores had the highest API (56.4) in Guaviare, with a malaria incidence of 66.1% for *P. vivax*, 19.5% for *P. falciparum* and 4.27% for mixed *P. falciparum/P. vivax* (INS 2010). These data suggest a situation of epidemic malaria. The present study was performed in periurban Miraflores, and is the first entomological report for this municipality.



Figure, 1 Map of Colombia depicting location of four municipalities in Guaviare Department

Materials and Methods

Study Site. Miraflores is situated in southeastern Amazonian Colombia (Fig. 2-7) at 213 meters, and has an average annual temperature of 27°C, average relative humidity of 86% and average annual rainfall of 2692.3 mm/year. Tropical wet rainforest is the dominant local Holdridge life zone of Amazonian Colombia (Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas 2000). Miraflores has an area of 12,756 km² and is designated as an Amazonian forest reserve within the National Wildlife Reserve Nukak (Ministerio del Medio Ambiente 1989). It is approximately 150 km from San José del Guaviare, the capital of Guaviare, and is accessible only by river (approximately 10 days along the Vaupés River from Calamar municipality) or by air (1.5 hr from San José del Guaviare). The economy is based on agriculture and logging. Miraflores is located on the northeastern margin of the Vaupés River. The rural area is occupied by more than ten

ethnic groups such as *Nukak Makú*, *Tucanos*, *Carijonas*. At least five of these groups are also found in the periurban area, as a result of displacement from armed conflict.

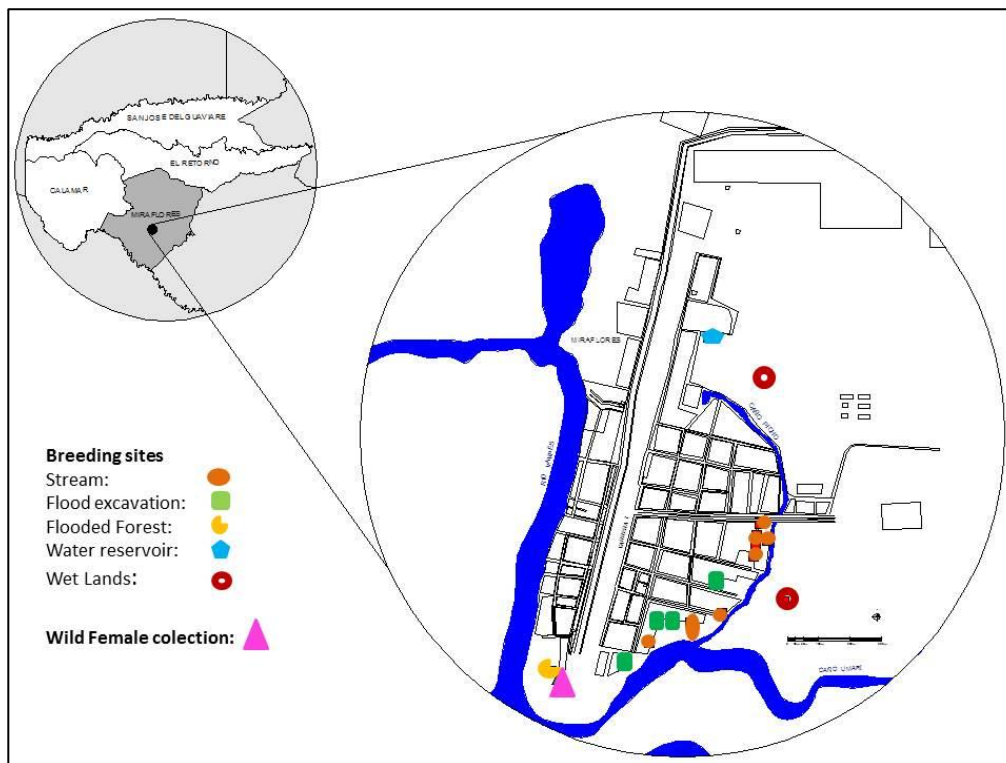
The urban area is occupied by settlers who have arrived as migrants attracted by economic booms including the exotic skin trade and coca cultivation. It is the major regional commercial center for food, clothing and medicine. Local institutional capacity is weak, influenced by groups involved in armed conflict. In general the population self-medicates and has poor nutritional status. The risk factors inherent in this situation favor malaria endemicity (CORPES 2004).

Mosquito Collections. In March (dry season) and September (rainy season) 2010, mosquito collections were conducted during three consecutive nights in the periurban neighborhood of La Paz (N 01°19'.01" - W 71°57.2'39") (Fig. 2-8), where malaria cases were previously reported, using peridomestic human landing catch (HLC) indoors and outdoors from 18:00 to 06:00 h, by a team of four collectors. Collectors worked in pairs, two indoors and two outdoors, and rotated every two hours to avoid collector bias. Mosquitoes were identified using the keys of Faran and Linthicum (1981), González and Carrejo (2009) and Rubio-Palis (2000), counted and maintained over desiccant for subsequent identification of *Plasmodium* species CS protein using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Live females were placed in plastic bottles labeled with collection information and provided with a 10% sugar solution. They were transported to the Laboratory of Entomology, Faculty of Agronomy, Universidad Nacional de Colombia (UNC) – Bogotá and blood fed on *Mus musculus* (protocol identification below). Isofamilies were obtained by forced mating (one leg and wing removed) and then each female was lightly anaesthetized with ethyl acetate and placed in water for oviposition (Estrada *et al.* 2003). F₁ progeny were used for taxonomic identification. One leg and wing of each specimen was mounted on a slide with Canada balsam. The number of mosquitoes caught per day per person (Human Biting Rate – HBR; WHO 1975) was estimated for the most abundant species, *An. darlingi*.

Plasmodium detection. Only heads and thoraces were tested for the CS protein of *P. falciparum* and *P. vivax* 210 and 247 by ELISA, following standard protocols (Wirtz *et al.* 1987ab, 1991, 1992). Mosquitoes were tested in pools of 5 specimens by collection method and date, to ensure that the probability of detecting more than one infected mosquito per pool is less than 1% (Rubio-Palis *et al.* 1992, Galardo *et al.* 2007, Magris *et al.* 2007). Negative controls were from the *An. albimanus* colony, Buenaventura strain, maintained at the Laboratory of Entomology, Faculty of Agronomy, UNC. The number of CS-positive *Plasmodium* pools was equivalent to the number of CS-positive mosquitoes; therefore the sporozoite rate was estimated as the percentage of CS-positive mosquitoes divided by the total number of mosquitoes assayed.

Anopheline larval collections. Breeding sites in periurban Miraflores were surveyed to detect and collect *Anopheles* larvae, using 500 ml ladles every 5 m, for a total of 50 dips per breeding site. The number of individual larvae collected per dip was recorded. Each collection was georeferenced, and hydrological parameters (temperature, depth, pH, apparent color, current, shade) and associated vegetation cover and type were recorded. At least ten breeding sites could not be sampled due probable presence of landmines.



Figure, 2 Breeding site and wild female collection locations in periurban Miraflores, Guaviare, Colombia, 2010

Ethics. HLCs were conducted using an informed consent agreement under a protocol and collection procedures that were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of UNC and by the Institutional Review Board of the Wadsworth Center, New York State Department of Health (NYSDOH), Albany, New York. Blood feeding of the mosquito females followed the vertebrate management protocols of the Faculty of Veterinary Medicine of UNC, the Ethics Committee on Animal Care of the National Institutes of Health - Office of Laboratory Animal Welfare (Assurance # A5791-01), and IACUC committee protocol # 11-420, NYSDOH.

Results

A total of 828 female anopheline mosquitoes representing four species were collected using HLC in 36 hours indoors and outdoors, during March and September. The most abundant species was *An. darlingi* ($n=789$), followed by *An. braziliensis* (Chagas) ($n=28$), and *An. oswaldoi* s.l. (Peryassu) s.l. ($n=6$). The mean biting rate for *An. darlingi* was 8.6, 1.3 for *An. braziliensis* and 0.7 for *An. oswaldoi* s.l. The biting activity of *An. darlingi* was analyzed to consider exposure during three periods determined by habits of the human population. The only time Miraflores has electricity is during the first period (P1), 18-22h; during the second period (P2), 22-03 h, people are in their homes; and during the last period (P3), 03-06 h, people begin daily activities (Fig. 2-9). During the dry season, exophagic activity was confined to P1; endophagy was the only biting behavior during P2-P3. In contrast, during the rainy season, both feeding behaviors occurred throughout the night (P1-P3). All 828 mosquitoes, representing 166 pools, were assayed by ELISA.

Only *An. darlingi* was positive for *P. vivax* 210, with a sporozoite rate (IF) of 0.13% (1/788). The infected mosquito was captured in March between 24:00 -1:00 h indoors.

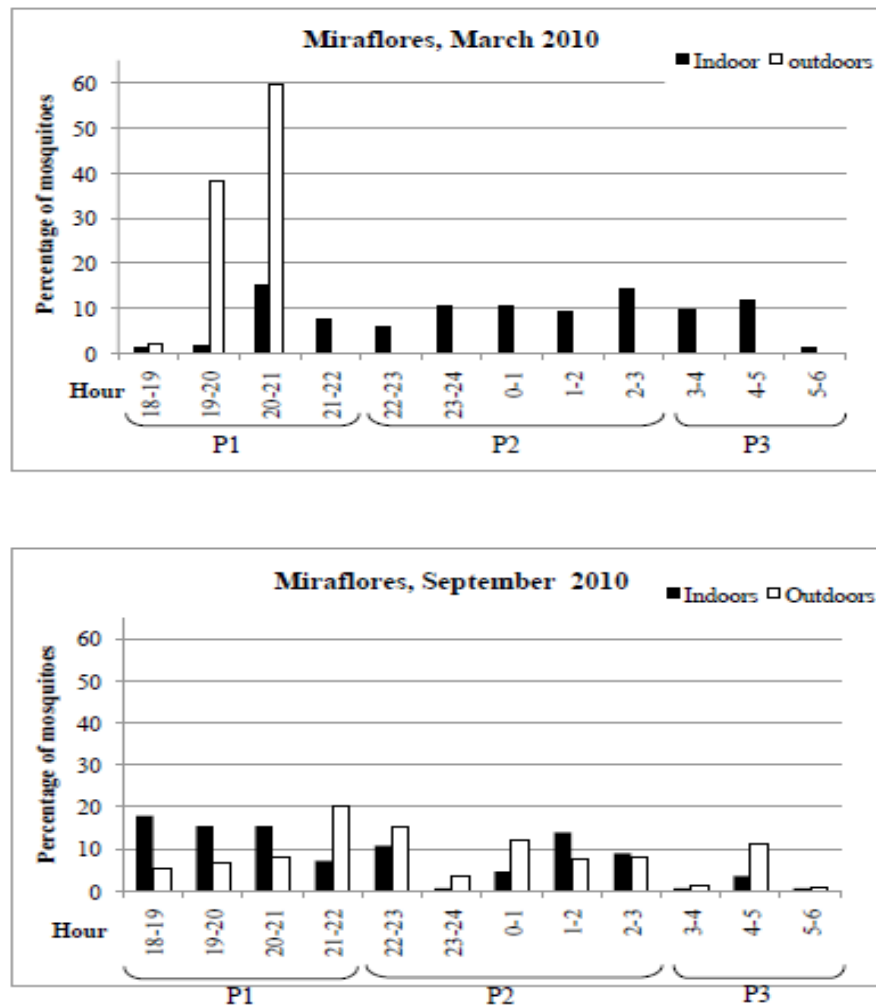
The main breeding sites in Miraflores were grouped into stream (43.7%), flooded excavations (25%), flooded forest (12.5%), wetlands (12.5%) and an abandoned water reservoir (6.25%) (Fig. 2-9). During the rainy season, water levels of the Vaupés River rise and flood part of the municipality, forming two major anopheline breeding sites (flooded forest and flooded excavation; Table 2-4). Three species were collected in these breeding sites: *An. darlingi* (64.5%) was the most abundant, followed by *An. oswaldoi* s.l. (25.8%). *Anopheles braziliensis* was present, but uncommon. A significant number of larvae ($n=38$) could not be identified due to high mortality of early instars during transportation to Bogotá.

Table, 1 Indoor, Outdoor human biting rate (HBR) of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) during three periods of the night in Miraflores, Guaviare, Colombia, 2010.

Period of night (P) and Hour	Human biting rate (HBR)			
	Indoors		Outdoors	
	March	September	March	September
P1				
18-19	0.3	8.3	0.1	2.3
19-20	0.5	7.1	3	2.8
20-21	4.1	7.1	5.1	3.3
21-22	2.1	3.3	0	8.6
P2				
22-23	1.6	5	0	6.5
23-24	2.8	0.3	0	1.5
0-1	2.8	2.1	0	5.16
1-2	2.5	6.5	0	3.16
2-3	3.8	4.1	0	3.3
P3				
3-4	2.6	0.3	0	0.5
4-5	3.1	1.6	0	4.8
5-6	0.3	0.3	0	0.3

Discussion

Anopheles darlingi has long been associated with a rainforest environment (Faran and Linthicum 1981, Consoli and Lourenço-de-Oliveira 1994) and it is considered the main Amazonian malaria vector (Zimmermann 1992, Lounibos and Conn 2000, Rubio-Palis 2000; Montoya-Lerma et al. 2011). In Miraflores, *An. darlingi* was caught throughout the night showing mainly exophagy (Fig. 2-9). Low densities were due to limited sampling effort; therefore we could not obtain adequate data to define biting patterns in the study area. However, *An. darlingi* was found naturally infected with *P. vivax* and the peak seasonal, indoor-outdoor biting times (Table 2-3) were related to human activities (Fig. 2-9). The behavior of the vector species influences the local epidemiological pattern, and the same populations of *An. darlingi* may show behavioral variation in response to environmental change in addition to seasonal fluctuation, thus increasing the complexity of malaria transmission dynamics (Charlwood 1996, Voorham 2002, Santos et al. 2009). Even with low *An. darlingi* capture rates, transmission by this species has been recorded in the Amazon region (Lanelli et al. 1998, Tadei et al. 1998, Conn et al. 2002).



Figure, 3 Percentage of mosquitoes (y-axis) collected per hour, between 18:00 h and 6:00 h (x-axis) by collection (indoor, outdoor) and season in Miraflores, Colombia. March – dry season; September – rainy season

Table, 2 Seasonal Anopheles immature forms collected from breeding site types in Miraflores, Guaviare, Colombia, 2010

Breeding site types						
Month	Species	abandoned				
		stream (n= 7)	flooded excavation (n= 4)	flooded forest (n=1)	wet- lands (n=2)	water reservoir (n=1)
	<i>An. darlingi</i>	5	2	1	1	0
March	<i>An. oswaldoi</i> s.l.	1	3	1	1	0
	<i>An. braziliensis</i>	0	1	0	0	1
	<i>An. darlingi</i>	5	1	3	1	1
Sept.	<i>An. oswaldoi</i> s.l.	1	0	1	0	0
	<i>An. braziliensis</i>	0	0	0	0	1

The Miraflores municipality may be in a permanent state of malaria outbreak. Possible reasons for this include migration of members of indigenous communities from high malaria transmission areas, uncontrolled movement of gold miners, the presence of a local army force where members also rotate among high and low transmission areas, and movement of regional traders. Also, drastic changes in the ecosystem, such as the cut and burn method of the forest clearing for crops and livestock, have likely contributed to risk factors for local *Plasmodium* transmission

Knowledge of fauna composition and vector behavior in wild areas is essential for the adoption of potential alternative vector control strategies aimed at preventing transmission. During the rainy season *An. darlingi* exhibited both exo- and endophagic biting behaviors, with exophagy much more pronounced during P2-P3 compared with dry season behavior, as was previously observed in Roraima state, Amazonian Brazil (Barros *et al.* 2007), and in other parts of the Amazon forest (Lanelli *et al.* 1998, Sá *et al.* 2005, Hiwat and Bretas 2011).

The main breeding sites were natural water collections as expected for the ecological conditions of Miraflores, where people live on the fringes of rainforest, only occupying a small area associated with the aircraft landing strip, but are continually expanding into the forest. Breeding was associated with human-made excavations because people use gravel for multiple purposes such as mining or house construction. All of the breeding

sites are well defined in the dry season, but during the rainy season, the Vaupés River floods the periurban area, forming two huge breeding sites. *An. darlingi* was found in all types of breeding sites, so in theory it can emerge from a breeding site, obtain a blood meal and then seek refuge in the forest where vector control is impractical. In this way, populations of *An. darlingi* can be maintained all year, contributing to both abundance and transmission.

Vector control is an important component of malaria control programs because it is one of the most efficient strategies to prevent transmission (Brochero and Quiñones 2008); however, forest malaria may be more difficult to control than nonforest malaria (Tadei et al. 2000, Galardo et al. 2009, Santos et al. 2009). Forest vectors are often partially or wholly exophilic and exophagic and do not normally enter houses protected by indoor residual spraying. In Miraflores, it is impractical to try to control immatures in breeding sites for *An. darlingi* because the species is so locally ubiquitous. Furthermore, such a strategy in periurban and urban areas of Miraflores is impossible due to the presence of landmines and armed conflict. Health Authorities could try to implement ITN use in all houses after considering local community attitudes, beliefs and practices, and use the results to evaluate changes in abundance or behavior of *An. darlingi* populations.

Furthermore, biological characteristics of wild female *An. darlingi*, which are behaviorally plastic (Voorham 2002), often biting outdoors, combined with their nocturnal activity, suggest that multiple control strategies might be more successful. Prevention and control strategies could focus on: 1) accurate diagnoses and adequate treatment for patients; 2) evaluation of response to treatment for drug resistance detection; 3) surveillance of asymptomatic persons arriving in urban areas from high transmission zones; 4) strengthening epidemiological notification to detect malaria associated with indigenous communities; 5) improved entomological surveillance to detect potential changes in behavioral patterns and relative species incrimination in local transmission. Finally, the reduced diversity of *Anopheles* species detected in this preliminary study in Miraflores may be the result of the limited number and frequency of collections, suggesting that further studies should be undertaken for a more comprehensive understanding of local malaria transmission patterns.

Acknowledgments

The authors thank Humberto Mosquera for assistance with field collections. We thank Laureano Mosquera, Entomological Unit coordinator, and technical personnel of the Guaviare Health Department, Colombia, for logistic support in Miraflores. We thank Maria Camila Ramirez for assistance with the maps (Fig. 1 and Fig. 2). We are grateful to Robert A. Wirtz, Centers for Disease Control (CDC), Entomology Branch, Atlanta, Georgia, USA, for ELISA reagents. This work was supported by US NIH grant AI R01 54139 "Malaria Vector Biology in Brazil: Genetics and Ecology" to JEC, and Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, Faculty of Agronomy Quipu 201010012197 to HB.

References

- Barros, F.S., Arruda, M.E., Vasconcelos, S.D., Luitgards-Moura, J.F., Confalonieri, U., Rosa-Freitas, M.G., et al.** 2007. Parity and age composition for *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) and *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga (Diptera: Culicidae) of the northern Amazon Basin, Brazil. *J. Vector Ecol.* 32: 54-68.
- Brochero, H., and M.L. Quiñones.** 2008. Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. *Biomedica* 28: 18-24.
- Charlwood, J. D.** 1996. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 391-398.
- Conn, J.E, Wilkerson, R.C., Segura, M.N., de Souza, R.T., Schlichting, C.D., Wirtz, R.A., and M.M. Póvoa** 2002. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 18-22.
- Consoli, R.A.G.B., and R. Lourenço-de-Oliveira.** 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro, 225 pp.
- Convenio CORPES – Gobernación del Guaviare.** 2004. Miraflores – Guaviare. Esquema de ordenamiento territorial Municipio de Miraflores. Documento técnico. Componente rural. 216 pp.
- Deane, L.M., Causey, O.R., and M.P. Deane.** 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões Nordeste e Amazonica do Brasil. *Bras. Rev. Serv. Esp. Saude Pub.* 1: 827– 966.
- Estrada, D.A., Quinones, M.L., Sierra, D.M., Ruiz, F., Erazo, H.F., and Y.M. Linton.** 2003. Egg morphology as an indirect method to identify *Anopheles benarrochi*, *Anopheles oswaldoi* and *Anopheles rangeli* (Diptera: Culicidae). *Biomedica* 23: 388-395.
- Faran, M., and K. Linthicum.** 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 13: 1–81.
- Galardo, A.K.R., Arruda, M., D’Almeida Couto, A.A.R., Wirtz, R.A., Lounibos, L.P., and R.H. Zimmerman.** 2007. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 461-469.
- González, R., and N. Carrejo N.** 2007. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia, claves taxonómicas y notas de distribución. Cali: Universidad del Valle; 237 pp.
- Hiwat H, Bretas G.** 2011. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit. Vectors* 4: 177.
- (INS) Instituto Nacional de Salud.** 2010. Sistema nacional de vigilancia en salud pública (SIVIGLIA). *Inf. Quinc. Epidemiol. Nac.* 11: 33–48.

- Lanelli, R.V., Honório, N.A., Lima, D.C., Lourenço-de-Oliveira, R., Santos, R.V., and C.E.A. Coimbra Jr. 1998.** Faunal composition and behavior of anopheline mosquitoes in the Xavante Indian reservation of Pimentel Barbosa, Central Brazil. *Parasite* 5:197-202.
- Lounibos, L.P., and J.E. Conn. 2000.** Malaria vector heterogeneity in South America. *Am. Entomol.* 46: 237-248.
- Magris, M., Rubio-Palis, Y., Menares, C., and L. Villegas. 2007.** Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 303-311.
- Mendoza, M., Nicholls, R., Olano, V.A., and L. Cortés. 2000.** Situación de la Malaria en Colombia. Manual de manejo integral de la malaria. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
- Ministerio del Medio Ambiente. 1989.** Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Naturales Nacionales de Colombia –UAESPNN, Unidad de parques, Bogotá.
- Montoya-Lerma, J., Solarte, Y.A., Giraldo-Calderon, G.I., Quinoñes, M.L., Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R.C., and R. González. 2011.** Malaria vector species in Colombia – A review. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz* 106 (Suppl. I): 223-238.
- Padilla, J., and S. Peña. 2002.** Situación epidemiológica de la malaria en Colombia. *Inf. Quinc. Epidemiol. Nac.* 7: 333-45.
- Póvoa, M.M., Wirtz, R.A., Lacerda, R.N.L., Miles, M.A., and D. Warhurst. 2001.** Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96:179-84.
- Rubio-Palis, Y. 2000.** *Anopheles (Nyssorhynchus)* de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica, Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental Dr. Arnoldo Gabaldon, Proyecto Control de Enfermedades Endémicas, Maracay, 121 pp.
- Rubio-Palis, Y., Wirtz, R.A., and C.F. Curtis. 1992.** Malaria entomological rate in Western Venezuela. *Acta Trop.* 52: 167-174.
- Sá, D.R., R. Souza-Santos, A.L. Escobar, C.E. Coimbra Jr. 2005.** Malaria epidemiology in the Pakaanóva (Wari') Indians, Brazilian Amazon. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 98: 28-32
- Santos, R.L., Padilha, A., Costa, M.D., Costa, E.M., Dantas-Filho, Hde. C., and M.M. Póvoa. 2009.** Malaria vectors in two indigenous reserves *Rev. Saúde Pública* 43: 859-868.
- (SINCHI) Instituto Amazónico de investigaciones científicas. 2000.** Plan de ordenamiento territorial. Gobernación del Guaviare-Colombia.
- Tadei, W.P., Thatcher, B.D., Santos, J.M.M., Scarpassa, V.M., Rodrigues, I.B., and M.S. Rafael. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 325-335.

- Tadei, W.P., and B. Dutary Thatcher. 2000.** Malaria vectors in the Brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 42: 87-94.
- Voorham J. 2002.** Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. Rev. Saude Publica. 36: 75-80.
- Wirtz, R.A., Burkot, T.R., Graves, P.M., and R.G. Andre. 1987a.** Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. J. Med. Entomol. 24: 433-437.
- Wirtz, R.A., Zavala, F., Charoenvit, Y., Campbell, G.H., Burkot, T.R., Schneider, I., Esser, K.M., Beaudoin, R.L., and R.G. Andre. 1987b.** Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. Bull. World Health Organ. 65: 39-45.
- Wirtz, R.A., Charoenvit, Y., Burkot, T.R., Esser, K.M., Beaudoin, R.L., Collins, W.E., and R.G. Andre. 1991.** Evaluation of monoclonal antibodies against *Plasmodium vivax* sporozoites for ELISA development. Med. Vet. Entomol. 5: 17-22.
- Wirtz, R.A., Sattabongkot, J., Hall, T., Burkot, T.R., and R. Rosenberg. 1992.** Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Plasmodium vivax*-VK247 sporozoites. J. Med. Entomol. 29: 854-857.
- (WMR) World Malaria Report: 2011.
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/

(WHO) World Health Organization. 1975. Manual of Practical entomology in malaria. Vol. II. Methods and techniques. Geneva: WHO; pg 13.

Zimmerman, R.H. 1992. Ecology of malaria vectors in the Americas and future directions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87 (Suppl. III): 371-383.

3. DISCUSIÓN GENERAL

La malaria es uno de los principales problemas de salud pública en Colombia. Esta enfermedad ha sido considerada casi exclusiva de las zonas rurales debido a que los sitios de reproducción de los vectores son escasos y menos favorables en las zonas densamente pobladas (OMS, 2000). Sin embargo, aunque los estudios han demostrado que los sitios de cría idóneos para anofelinos disminuyen con el aumento de la proximidad al centro de las zonas urbanas (Coene *et al.*, 1993) la transmisión de la malaria continúa en zonas periurbanas y en ocasiones se reportan casos en zonas urbanas (Padilla, 2011).

Estudios epidemiológicos, y socioeconómicos coinciden que históricamente la malaria ha sido la enfermedad que con más eficacia ha alejado al hombre de la posesión de la tierra, y que las regiones atacadas no pueden competir económicamente con las que están libres de ella, debido a la disminución de la capacidad productiva del trabajador rural por morbilidad (incapacidad) y por mortalidad (años potencialmente perdidos a nivel laboral)(Guerra *et al.* 2006, Vittor *et al.* 2006, Yasuoka & Levins 2007).

Los departamentos de Guaviare y del Vichada caracterizados por presentar asentamientos rurales y semi urbanos con sistemas agrícolas, y sitios de cría de peces como una de las principales fuentes de alimento y de ingreso económico; en la actualidad se enfrentan a fuertes procesos de deforestación y en general eventos de destrucción de hábitat, motivados por la expansión de la frontera agrícola, y procesos de urbanización. Esto, ha llevado a que varias especies de vectores encuentren nuevos hábitats para la supervivencia de larvas y adultos (Weiss & McMichael 2004, Brochero *et al.* 2007). Por lo tanto el desarrollo agrícola influye de forma directa en la densidad y sitios de cría de los vectores de malaria. Procesos como la regularización de los cursos de agua, drenajes, nivelación del suelo, relleno de lagunas y pantanos y eliminación de vegetación próxima a las viviendas que sirven como refugios para los mosquitos vectores, contribuyen a disminuir la incidencia de la enfermedad en zonas rurales del país.

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombiano, las actividades agrícolas constituyen una de las principales fuentes de empleo en el país, además de representar una de las principales fuentes de ingresos de divisas mediante exportaciones de productos agropecuarios. Enfermedades incapacitantes como la malaria reducen hasta en un 25% el rendimiento de un trabajador afectando no solamente a los países maláricos sino también aquellos no maláricos o poco afectados por la enfermedad; debido a que las importaciones de productos agrícolas procedentes de países maláricos llevan implícito un sobrecosto no inferior al 5% generado en la producción por enfermedad o muerte de los trabajadores. (MADR, 2001)

La utilización común de insecticidas para controlar las enfermedades transmisibles por vectores, y para el control de los artrópodos que ocasionan pérdidas económicas en la producción agrícola genera un fuerte nexo entre la agricultura y la salud. De acuerdo con la OPS/OMS (2000), las zonas donde se usan ampliamente los insecticidas en la agricultura por lo general están superpuestas a las áreas de resistencia de los vectores de malaria a dichos productos químicos. La aplicación de insecticidas en el campo agrícola ejerce una presión selectiva al actuar sobre casi toda la población anofelina existente en el área (machos, hembras, larvas y adultos). Contrario a lo que sucede con los rociamientos intradomiciliarios, o el uso de toldillos impregnados de larga duración utilizados por las secretarías de salud departamentales los cuales actúan únicamente sobre las hembras que llegan a la vivienda, lo que representa sólo una pequeña parte de la población anofelina existente.

Con respecto a esto, en cultivos de gran interés económico para Colombia como la palma de aceite y particularmente arroz han registrado vectores de malaria y morbilidad por malaria en sus trabajadores, debido a la modificación del suelo por maquinaria pesada que genera hundimientos que con la lluvia se constituyen en importantes sitios de cría para los vectores de malaria y por los sistemas de irrigación, que no siempre pueden ser intermitentes (Ministerio de Agricultura y desarrollo rural 2004).

Por tanto el estudio de la biología y ecología de las especies es un elemento esencial para el desarrollo estrategias de manejo, mitigación y control de organismos considerados como plaga (With 2002; Jaramillo *et al.* 2006) que permitan minimizar los costos de producción en los sistemas agrícolas. Estos sistemas agrícolas productivos requieren de importantes modificaciones en el paisaje que influyen en la dinámica de los organismos, por lo que el tipo de hábitat y sus características, influyen en gran medida las relaciones intra e inter específicas, el ciclo de vida y los mecanismos co-evolutivos entre los organismos, actuando como un aspecto determinante en la abundancia de las especies huésped y plaga, su distribución, los procesos de selección de huésped, la variabilidad genética y finalmente el surgimiento de brotes de patógenos o plagas en general (Wallner 1987; Ricci *et al.* 2009).

Además de la vocación agrícola, ganadera y minera característica de las regiones rurales de Colombia que determinan cambios bruscos en el paisaje y uso intensivo del suelo, lo que favorece sitios de cría aptos para los vectores de malaria durante todo el año; características climáticas y biológicas de los anofelinos determinan la dinámica de transmisión de malaria en zonas endémicas. Los escenarios de transmisión se complejizan si se tienen en cuenta aspectos como 1) La Descentralización del sistema de vigilancia, prevención y control de la malaria hacia las entidades departamentales. Estas no cuentan con los recursos humanos y financieros suficientes para el mantenimiento y continuidad de los programas de control integrado, selectivo e integral de vectores a largo termino, 2) Problemas derivados del conflicto armado que determinan acciones puntuales y no regulares en algunas áreas del país, 3) El uso de insecticidas no racionalizado en el marco de un sistema de manejo y control integrado de vectores, con personal capacitado y equipos calibrados permanentemente; y 4) la intensificación del uso del suelo tanto por actividades económicas como por asentamientos no planificados, particularmente en áreas periféricas de ciudades capitales que reciben poblaciones susceptibles y portadoras y contribuyen con nuevos sitios de cría aptos para los mosquitos. (Brochero *et al.*, 2005)

En este contexto, el estudio de insectos que transmiten enfermedades a humanos en zonas vulnerables como es la Orinoquia Colombia constituye un aporte para las autoridades de salud locales y nacionales con el propósito de comprender mejor los posibles escenarios de transmisión y para contar con elementos que permitan orientar estrategias de control integrado y selectivo de vectores acorde con las características propias del área endémica para malaria. Esto es particularmente importante debido a que Colombia priorizó la malaria en las metas del milenio para el componente de salud (CONPES 2012)

An. darlingi es considerado el principal vector de malaria en la región de la Amazonía y la Orinoquia (Olano *et al.*, 2001, Montoya-Lerma *et al.*, 2011). En este trabajo, esta especie fue la más abundante y se encontró infectada por parásitos del género *Plasmodium* en todos los sitios de estudio. Además presentó una actividad durante toda la noche dentro y fuera del domicilio exhibiendo un comportamiento exofágico y endofágico descrito para la especie (Acosta, 1969; Elliott, 1972; Forattini, 1987; Charlwood, 1980, Rubio-Palis, 1995; Rubio-Palis, 2000). *An. darlingi* presentó diferencias en los patrones de comportamiento de picadura que dependió de la densidad de la especie, con una actividad constante durante la noche en los meses en que se registró una baja densidad, en tanto que en los meses de mayor densidad se observaron picos de actividad entre las 19-22hrs y las 2-4hrs. Este comportamiento confirma la plasticidad en los hábitos de picadura que han sido observados para la especie en América. Voorham, 2002; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002).

En este contexto, se puede establecer que la población humana en las localidades de estudio tiene el mismo riesgo de contacto con el mosquito tanto en el intra como en el peridomicilio. El nivel de exposición a la picadura por este mosquito se ve incrementado por las actividades humanas entre las 18- 22 hrs en el intradomicilio y peridomicilio y entre las 4:00 y 6:00 h en el intradomicilio; periodos que coinciden con los mayores porcentajes de contribución de actividad de picadura observados para *An. darlingi* en cada uno de estos ambientes. Con respecto al periodo entre las 22:00 y las 4:00 h, se observó un incremento en la actividad intradomiciliar entre las 12 -2h en las tres localidades de estudio, y fue en estas horas en que se encontraron los mosquitos infectados; este tipo de comportamiento puede estar respondiendo a la disponibilidad de alimento sanguíneo dado que la gente se encuentra durmiendo y está desprotegida debido al tipo de viviendas, algunas de ellas con paredes hechas con palos y plásticos, y otras con orificios que permiten la entrada del vector a la vivienda. No obstante estos patrones pueden variar localmente de acuerdo a la región geográfica, la estación climática, y las dinámicas de la población (Elliot, 1972; Charlwood, 1980; Forattini 1987; Tadei, 1998; Rozendaal, 1989; Klein y Lima 1990; Rubio-Palis, 1995; León *et al.*, 2003; Tineo *et al.*, 2003; Achee *et al.*, 2006; Brochero *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007; Magris *et al.*, 2007; Girod *et al.*, 2008).

An. darlingi fue recolectada en diversos sitios de cría que incluyeron ambientes naturales y artificiales con presencia de vegetación circundante o emergente para proporcionar el refugio necesario que se ha establecido asegura la sobrevivencia de las larvas (Orr y Resh, 1989), sin embargo, esta especie también se encontró en sitios completamente expuestos al sol lo que confirma su capacidad de adaptación a ambientes fuertemente modificados colonizando nuevos y diferentes sitios de cría, en áreas periurbanas, que contribuyen a la presencia de ésta especie durante todo el año aumentando el riesgo de exposición de la población humana a su picadura (Pinedo-Cancino *et al.*, 2006, Vittor *et*

al., 2006, Singer y De Castro, 2006; Sallum *et al.*, 2008). En las localidades de estudio, esta especie estuvo asociada a sitios de cría ubicados en grandes extensiones de suelo, resultado del desbordamiento de grandes ríos como el Orinoco, Meta, Guaviare y Vaupés, lo que dificulta su control en estadios inmaduros.

Los miembros del complejo *Albitarsis* no son considerados vectores de malaria en Colombia; sin embargo, en este trabajo *An. albitarsis* s.l se encontró en simpatria con *An. darlingi* durante todo el año, con actividad durante las cuatro primeras horas de la noche, tiempo que coincide con el periodo de mayor exposición de la población a las picaduras en el intradomicilio y peridomicilio. Además, *An. albitarsis* F se encontró naturalmente infectada por *P. falcíparum* y *P. vivax* en una de las tres localidades estudiadas y fue la más frecuente en los sitios de cría periurbanos de Puerto Carreño, y San José del Guaviare presentando preferencia por criaderos de tipo permanente y de origen antrópico como estanques piscícolas que determinan una gran cercanía a las viviendas por ser la fuente de ingreso económico de los pobladores aumentando el riesgo de contacto con el vector.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

1. Debido a que *An. darlingi* se encontró infectado con *Plasmodium falciparum*, y *P. vivax*, presentó una amplia distribución y exhibió un comportamiento exofágico y exofílico con una marcada antropofilia se confirma su papel como vector principal de malaria en las áreas de estudio.
2. *An. albitarsis* s.l está presente junto con *An. darlingi* y debido a que se encontró infectada por *P. vivax* (VK 210) y *P. falciparum*, y con actividad de picadura durante el tiempo en que la población está más expuesta a las picaduras, se considera que esta especie puede estar actuando como vector secundario contribuyendo a mantener el carácter endémico de la malaria durante todo el año en Puerto Carreño, Vichada.
3. Debido a las características biológicas registradas para *An. darlingi*, las estrategias de control deben estar dirigidas hacia los adultos para reducir el contacto hombre vector y la densidad de la población de ésta especie.
4. Como resultado de las actividades humanas existen sitios de cría naturales y artificiales que poseen condiciones favorables para la cría no solo del vector primario *An. darlingi* reportado para las localidades de estudio sino para otras especies de *Anopheles* como *An. albitarsis* s.l
5. Debido a que *An. albitarsis* F se encontró infectado por *P. falciparum* con una elevada tasa de inoculación entomológica y adaptada a sitios de cría próximos a las viviendas, las especies del complejo *Anopheles Albitarsis* deben ser objeto de vigilancia entomológica rigurosa y permanente para determinar con mayor énfasis su importancia epidemiológica en las áreas de estudio
6. Las condiciones geográficas, climáticas, económicas, sociales, y de paisaje propias de cada región aunado a los procesos de intervención antrópica, complejizan la dinámica de transmisión de malaria en las localidades de estudio.
7. Las condiciones climáticas presentes en temporada de lluvia y temporada seca determinan la dinámica de sitios de cría que influyen en la presencia o ausencia de especies de *anofelinos*.
8. En los eventos de muestreo se encontraron diferencias en las abundancias de especies de anofelinos que pueden estar relacionadas a las condiciones climáticas en el momento del muestreo.

4.2 Recomendaciones

1. De acuerdo a los patrones de comportamiento de picadura observados para las especies de *Anopheles* y particularmente *An. darlingi* y *An. albitarsis* s.l se sugiere el uso de telas impregnadas con insecticidas de larga duración, complementada con medidas de protección personal como el uso de repelentes para reducir el contacto hombre-vector en las horas en que la población está más expuesta a las picaduras de los mosquitos.
2. La realización de este tipo de trabajos contribuyen la base para reorientar las estrategias de control en los vectores de malaria en zonas endémicas, pero también constituye un llamado de atención sobre la necesidad de adelantar estudios entomológicos sistemáticos locales que le permitan al país conocer su realidad epidemiológica y entomológica en concordancia con los cambios del último milenio.
3. El conocimiento sobre la composición de la fauna y el comportamiento de insectos vectores de enfermedades constituye un factor fundamental para la prevención y control de malaria en zonas endémicas. Las autoridades nacionales y locales deben hacer uso de este conocimiento para definir estrategias de control integrado y selectivo acorde con las características propias de cada localidad

Bibliografía

- [1] AHUMADA ML, PAREJA PX, BUITRAGO LS, QUIÑONES ML. Comportamiento de picadura de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) y su asociación con la transmisión de malaria en Villavicencio (Meta, Colombia). *Biomédica*. 2013;33(2).
- [2] BARROS FS, ARRUDA ME, VASCONCELOS SD, LUITGARDS- MOURA JF, CONFALONIERI U, ROSA-FREITAS MG, *et al.* Parity and age composition for *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) and *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribázcaga (Diptera: Culicidae) of the northern Amazon Basin, Brazil. *J Vector Ecol*. 2007;32(1):54-68. DOI: 10.3376/1081 1710(2007)32[54:PAACFA]2.0.CO;2
- [3] BEIER JC, ASIAGO CM, ONYANGO FK, GARGAN TP, WIRTZ RA, KOECH DK, ROBERTS CR: 1988.,ELISA absorbance cut-off method affects malaria sporozoite rate determination in wild Afrotropical *Anopheles*. *Med Vet Entomol* 2, 259 264.
- [4] BELKIN J, SCHICK R, GALINDO P, AITKEN T. Estudios sobre mosquitos (Diptera: Culicidae). Ia. Un proyecto para un estudio sistemático de los mosquitos de Mesoamérica. Ila. Métodos para coleccionar, criar y preservar mosquitos. *Contrib Am Entomol Inst* 1967;1:163-80
- [5] BERTI J, VANEGAS C, AMARISTA J, GONZÁLES J, MONTAÑEZ H, CASTILLO M, GUZMÁN H, GONZÁLES J. Inventario preliminar y observaciones biológicas sobre los anofelinos (Diptera: Culicidae) de una región minera del estado de Bolívar, Venezuela. *Bol Entomol Venez*. 1998; 13:17-26
- [6] BRANQUINHO MS, ARAÚJO MS, NATAL D, MARRELLI MT, ROCHA RM, TAVEIRA FA, KLOETZEL JK. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996; 90:233
- [7] BROCHERO H, REY G, BUITRAGO LS, OLANO VA. Biting activity and breeding sites of *Anopheles* species in the municipality Villavicencio, Meta, Colombia. *J Am Mosq Control*. 2005;21:182-6.
- [8] 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*.2006;26:269-77.
- [9] BROCHERO H, QUIÑONES L. Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. *Biomédica*. 2008; 28:18-24

- [10] BROCHERO HL, LI C, WILKERSON R, CONN JE, RUIZ-GARCÍA M. Genetic structure of *Anopheles* (Nyssorhynchus) *marajoara* (Diptera: Culicidae) in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:585-95.
- [11] CHARLWOOD JD. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root 1926. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91:391-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000400001>
- [12] CIENFUEGOS, A.V., GÓMEZ, G.F., CÓRDOBA, L.A., LUCKHART, S., CONN, J.E., CORREA, M.M., Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Rev. Biomed.* 2008. 19, 35–44.
- [13] COENE J: Malaria in urban and rural Kinshasa: the entomological input. *Med Vet Entomol* 1993, 7:127-37.1-],
- [14] COLLINS WE, WARREN M, SKINNER JC, SUTTON BB. Infectivity of two strains of *Plasmodium vivax* to *Anopheles albittarsis* mosquitoes from Colombia. *J Parasitol.* 1985;71:771-3.
- [15] CONSOLI RAGB, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994. 225 pp.
- [16] CONN JE, WILKERSON RC, SEGURA MN, DE SOUZA RT, SCHLICHTING CD, WIRTZ R, *et al.* Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and land use. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:18-22.
- [17] CONN J, WILKERSON RC, SEGURA M, DE SOUZA R, SCHLICHTING CD, WIRTZ R, POVOA M. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66:18-22.
- [18] CONVENIO CORPES – Gobernación del Guaviare. 2004. Miraflores – Guaviare. Esquema de ordenamiento territorial Municipio de Miraflores. Documento técnico. Componente rural. 216 paginas
- [19] DEANE LM, CAUSEY OR, DEANE MP. Notas sobre a distribucao e a biología dos anofelinos das regions Nordeste e Amazonica do Brasil. *Braz Serv Espec Saúde Pública Rev.* 1948; 827-965
- [20] DA SILVA-VASCONCELOS, A., KATO´ , M.Y., MOURA´O, E.N., DE SOUZA, R.T., LACERDA, R.N., SIBAJEV, A., TSOURIS, P., PO´VOA, M.M., MOMEN, H., ROSA-FREITAS, M.G., Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 2002. 97, 151–161.
- [21] DANTUR JURI MJ, ZAIDENBERG M, CLAPS GL, SANTANA M, ALMIRON WR Malaria transmission in two localities in Northwestern Argentina. *Malar J* 2009.8: 18.
- [22] DEANE LM. Malaria vector in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 81:5

- [23] DE LA HOZ J. Geografía económica de la Orinoquia. Banco de la República de Colombia. 2009.p
- [24] ELLIOTT R. The influence of vector behaviour on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 1972;21:765-63.
- [25] EQUIPO DE SALUD PÚBLICA MUNICIPAL. Plan municipal de salud pública 2.008 – 2.011. Puerto Carreño, Vichada. Alcaldía Mayor Municipal.2008.pg 6
- [26] ESTRADA DA, QUIÑONES ML, SIERRA DM, CALLE DA, RUIZ F, ERAZO HF, *et al.* Utilidad de la morfología de los huevos como método indirecto para identificar *An. benarrochi*, *An. oswaldoi*, y *An. rangeli* en Putumayo, Colombia. *Biomédica.* 2003;23:388-95.
- [27] FARAN ME. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Contrib Am Entomol Inst.* 1980;15:1-215.
- [28] FARAN ME, LINTHICUM KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae).*Mosq Syst.* 1981;13:1-81.
- [29] FLEMING G. Biology and ecology of malaria vectors in the Americas. Washington, DC: Pan American Health Organization, 1986, PNSP/86-72.
- [30] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R, VRIJENHOEK R., DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome c Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1994., 3:294-299.
- [31] FORATTINI OP. Comportamento exofilo de *Anopheles darlingi* Root, em regio meridional do Brasil. *Rev Saúde Públ.* 1987;21:291-304.
- [32] GALARDO AKR, ARRUDA M, D'ALMEIDA COUTO AAR, WIRTZ RA, LOUNIBOS LP, ZIMMERMAN RH Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Amer J Trop Med Hyg* 2007.76: 461-469.
- [33] GIL LH, TADA MS, KATSURAGAWA TH, RIBOLLA PE, SILVA LH., Urban and suburban malaria in Rondonia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 102 271-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000013>
- [34] GIROD R, GABORIT P, CARINCI R, ISSALY, FOUQUE F. *Anopheles darlingi* bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:702-10.
- [35] GONZÁLEZ R, CARREJO N. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia, claves taxonómicas y notas de distribución. Cali: Universidad del Valle; 2007. p. 237

- [36] HERRERA S, SUÁREZ M, SÁNCHEZ G, QUIÑONES ML, HERRERA M. Uso de la técnica inmunoradiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoítos de *Plasmodium*. Colombia Médica. 1987;18:2-6.
- [37] HALL T F. The influence of plants on anopheline mosquito breeding. Am J Trop Med Hyg, 1972. 21:787-794.
- [38] HERRERA, S., SUAREZ,M., SANCHEZ, G., QUIÑONES,M., HERRERA,M., Uso de la técnica inmuno-radiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoítos de *Plasmodium*. Colombia Med. 1987. 18, 2–6.
- [39] INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. Diccionario Geográfico de Colombia. Bogotá: Replolaser Ltda.; 1996. p. 2328-9.
- [40] INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2009.
- [41] INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública- SIVIGILA; 2009. Inf Quinc Epidemiol Nac 51
- [42] INSTITUTO AMAZÓNICO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS SINCHI. Plan de ordenamiento territorial, 2.000. Departamento del Guaviare
- [43] INSTITUTO NACIONAL DE SALUD - INS,. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica N°52. Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Dic. 26 de 2010 – Enero 1 de 2010, 9 pp.
- [44] JIMÉNEZ P, CONN J, WITZ R, BROCHERO H., 2012 *Anopheles* (Díptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia. Biomédica. 32 (Supl. 1):13-21.
- [45] LANELLI , HV, HONORIO NA, LIMA DC, LOURECO-DE- OLIVEIRA R, SANTOS RV, COIMBRA JUNIOR CE.,1998. Faunal composition and behavior of anopheline mosquitoes in the Xavante Indian Reservation of Pimentel Barbosa Central Brazil. Parasite 5,197-202
- [46] LEHR MA, KILPATRICK CW, WILKERSON RC, CONN JE. Cryptic species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence betweenRAPD-PCR identification and analysis of mtDNA *COI* gene sequences. Ann Entomol Soc Am. 2005; 98:908-17
- [47] LOUNIBOS LP, CONN JE 2000. Malaria vector heterogeneity in South America. Am Entomol 46: 237-248.
- [48] MACDONALD, G., 1957. The Epidemiology and Control of Malaria. Oxford University Press, Oxford.

- [49] MAGRIS M, RUBIO-PALIS Y, MENARES C, VILLEGAS L. Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River Southern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:303-11.
- [50] MANTILLA G, OLIVEROS H, BARNSTON AG. The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960-2006. *Malar J*. 2009; 8:6.
- [51] MENDOZA M, NICHOLLS R, OLANO VA, CORTÉS L, 2000. *Situación de la Malaria en Colombia. Manual de Manejo integral de la malaria*. Bogota: Instituto Nacional de Salud.
- [52] MERRITT TJS, YOUNG CR, VOGT RG, WILKERSON RC, QUATTRO JM. Intron retention identifies a malaria vector within the *Anopheles (Nyssorhynchus) Albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol*. 2005;35:719-24.
- [53] MONTOYA-LERMA J, SOLARTE YA, GIRALDO-CALDERON GI, QUIÑONES ML, RUIZ-LOPEZ F, WILKERSON RC, *et al*. Malaria vector species in Colombia – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(Supl.1):223-38. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028>
- [54] MORENO JE, RUBIO-PALIS Y, PÁEZ E, PÉREZ E, SÁNCHEZ V., Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. *Med Vet Entomol*. 2007. 21, 339-49. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2007.00704.x>
- [55] OLANO V, BROCHERO H, SÁENZ R, QUIÑONES M, MOLINA J. Mapas preliminares de la distribución de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica*. 2001;21:402-3.
- [56] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. 150 Informe del comité de expertos de la OMS en biología de vectores y lucha antivectorial. Geneve, 1992:784 (Serie Informes Técnicos; no 818)..
- [57] PADILLA J, PEÑA S. Situación epidemiológica de la malaria en Colombia. 2011. *Inf Quinc Epidemiol Nac*, 333-45.
- [58] PADILLA JC, ÁLVAREZ G, MONTOYA R, CHAPARRO P, HERRERA S., Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011. 106, 114-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900015>
- [59] POVEDA G, ROJAS W, QUIÑONES M, VÉLEZ I, MANTILLA R, RUIZ D, *et al*. Coupling between annual and ENSO timescales in the malaria–climate association in Colombia. *Environ Health Perspect*. 2001;109: 489-93.
- [60] REJMÁNKOVÁ E, RUBIO-PALIS Y, VILLEGAS L.. Larval habitat of Anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J Vector Ecol* 1999, 24:130

- [61] ROSA-FREITAS MG. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *deaneorum*: A new species in the albitarsis complex (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:535-43.
- [62] RUBIO-PALIS Y. Observaciones sobre el patrón de actividad hematofágica del vector de la malaria *Anopheles darlingi* en las poblaciones del sur de Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 1995;35:66-70.
- [63] RUBIO-PALIS Y. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Maracay: Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental; 2000. p. 120
- [64] WIRTZ RA, BURKOT TR, GRAVES PM, ANDRE RG. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. J Med Entomol. 1987;24:433-7.
- [65] RUIZ F, QUIÑONES ML, ERAZO HF, CALLE DA, ALZATE JF, LINTON YM. Molecular differentiation of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from Southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 155-60
- [66] RUBIO-PALIS, Y., ZIMMERMAN, R., 1997. Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. J. Med. Entomol. 1997, 34, 499–510.
- [67] RUIZ F, LINTON YM, PONSONBY DJ, CONN JE, HERRERA M, QUINONES ML, VELEZ ID, WILKERSON RC., Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010. 105, 899-903.
- [68] SERVICIO DE ERRADICACION DE LA MALARIA SEM 1957. *Plan para la erradicación de la malaria en Colombia, Republica de Colombia*, Ministerio de Salud Publica y Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organizacion Mundial de la Salud, Vol II, Bogotá, 635 pp.
- [69] SINKA ME, RUBIO-PALIS Y, MANGUIN S, PATIL AP, TEMPERLEY WH, GETHING PW, *et al.* The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors. 2010;3:72. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-72>.
- [70] SOARES GIL LH, ALVES FP, ZIELER H, SALCEDO JMV, DURLACHER RR, CUNHA RP, Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. *J Med Entomol* 2003. 40: 636–641.
- [71] STRESMAN GH. Beyond temperature and precipitation: Ecological risk factors that modify malaria transmission. *Acta Tropica*. 2010; 116:167-72.-7
- [72] TADEI W, THATCHER B, SANTOS J, SCARPASSA V, RODRIGUES I, RAFAEL M. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:325-35.

- [73] VITTOR, A.Y., GILMAN, R.H., TIELSCH, J., GLASS, G., SHIELDS, T., LOZANO, W.S., PINEDO- CANCINO, V., PATZ, J.A., The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006. 74, 3–11.
- [74] WIRTZ, R.A., ZAVALA, F., CHAROENVIT, Y., CAMPBELL, G., BURKOT, T., SCHENEIDER, I., ESSER, K., BEAUDOIN, R., ANDRE, R., Comparative testing of *Plasmodium falciparum* sporozoite monoclonal antibodies for ELISA development. *Bull World Health Organ.* 1987a, 65, 39–45.
- [75] WIRTZ, R.A., BURKOT, T.R., GRAVES, P.M., ANDRE, R.G., Field evaluation of enzymelinked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J. Med. Entomol.* 1987b, 24, 433–437..
- [76] WIRTZ, R.A., CHAROENVIT, Y., BURKOT, T.R., ESSER, K.M., BEAUDOIN, R.L., COLLINS, W.E., ANDRE, R.G., Evaluation of monoclonal antibodies against *Plasmodium vivax* sporozoites for ELISA development. *Med. Vet. Entomol.* 1991. 5, 17–22.
- [77] WIRTZ, R.A., SATTABONGKOT, J., HALL, T., BURKOT, T.R., ROSENBERG, R., 1992. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Plasmodium vivax*-VK247 sporozoites. *J. Med. Entomol.* 29, 854–857.
- [78] WHO, A Global Strategy for Malaria Control. World Health Organization, 1993. p. 44.
- [79] WHO - World Health Organization 2008. *World Malaria Report* WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, 2008, 215 pp
- [80] WHO -World Health Organization. Manual of practical entomology in malaria. Methods and techniques. Geneva: WHO; 1975. p13.
- [81] WILKERSON RC, PARSON TJ, KLEIN TA, GAFFIGAN TV, BERGO E, CONSOLIM J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J Med Entomol.* 1995;32:697-704.
- [82] YASUOKA J, LEVINS R Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 2007.76: 450-460.
- [83] ZAPATA, M.A., CIENFUEGOS, A.V., QUIROS, O.I., QUINONES, M.L., LUCKHART, S., CORREA, M.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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007, 77, 67–72.
- [84] ZIMMERMAN RH. Ecology of malaria vectors in the Americas and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, 87 (Supl. III): 371 383