

# Identificación de *Anopheles* spp. (Diptera:Culicidae) presentes en áreas endémicas de transmisión de malaria en Turbo, Antioquia y su infección con *Plasmodium* spp.

Identification of *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) present in endemic areas of malaria transmission in Turbo, Antioquia, and their infection with *Plasmodium* spp.

Boris René Zuleta-Ruiz<sup>1\*</sup>, Wilber Gómez-Vargas<sup>2</sup>, Adriana Ortiz-Reyes<sup>3</sup>, Freddy Ruiz-López<sup>4</sup>

## Resumen

La malaria es un grave problema de salud pública en Colombia, con *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* como los parásitos responsables del 97% de los casos. En el año 2019 el departamento de Antioquia presentó 7076 casos de malaria, siendo el municipio de Turbo uno de los más afectados. El objetivo de esta investigación fue determinar las especies de *Anopheles* spp. presentes en áreas endémicas de transmisión de malaria en Turbo, Antioquia, y evaluar su infección natural con *Plasmodium* spp. Se realizaron cuatro muestreos entre 2015 y 2016; los mosquitos fueron recolectados en el intradomicilio, peridomicilio y animales de corral; además, se realizó búsqueda activa de especímenes inmaduros en criaderos naturales. Se recolectaron 121 mosquitos adultos, pertenecientes a cuatro especies, *An. albimanus* ( $n = 117$ ), *An. triannulatus* s.l. ( $n = 1$ ), *An. apicimacula* s.l. ( $n = 1$ ) y *An. pseudopunctipennis* s.l. ( $n = 2$ ). Igualmente, se recolectaron 65 larvas pertenecientes a tres especies, *An. albimanus* ( $n = 58$ ), *An. triannulatus* ( $n = 1$ ) y *An. apicimacula* ( $n = 6$ ). Ninguno de los especímenes recolectados fue encontrado infectado con *Plasmodium*. *Anopheles albimanus* podría ser el principal vector de malaria en las localidades estudiadas. Posiblemente, *An. pseudopunctipennis* s.l. puede jugar un papel en la transmisión de malaria en presencia de personas infectadas y con altas densidades. Las bajas densidades de mosquitos encontradas en este estudio indican que las estrategias de control desarrolladas en los años 2014-2015, por las instituciones de salud locales, con *Bacillus sphaericus* e insecticidas están resultando eficaces.

**Palabras claves:** identificación, *COI*, mosquito, paludismo, vectores

## Abstract

Malaria is a serious public health problem in Colombia, with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* as the parasites responsible for 97% of malaria cases. The municipality of Turbo is one of the most affected departments in Antioquia, recording 7076 malaria cases in 2019. The objective was to identify the *Anopheles* spp. present in endemic areas of malaria transmission in Turbo and to evaluate their natural infection with *Plasmodium* spp. A total of four samplings were carried out between 2015 and 2016 in both wet and dry seasons each year. The mosquitoes were collected in the intra-domicile and peri-domicile, and on corral animals. In addition, active searches were carried out for immature stages in natural breed sites of water pools. A total of 121 adult mosquitoes were collected, belonging to four species: *An. albimanus* ( $n = 117$ ), *An. triannulatus* s.l. ( $n = 1$ ), *An. apicimacula* s.l. ( $n = 1$ ) and *An. pseudopunctipennis* s.l. ( $n = 2$ ). Sixty-five

1. Facultad Nacional de Salud Pública - Universidad de Antioquia.

2. Instituto Colombiano de Medicina Tropical - Universidad CES (ICMT-CES).

3. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Colombia.

4. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) - Universidad de Antioquia.

\* Autor para correspondencia: <zuletas21@gmail.com>

larvae belonging to three species were collected by active searches: *An. albimanus* ( $n = 58$ ), *An. triannulatus* ( $n = 1$ ) and *An. apicimacula* ( $n = 6$ ). None of the specimens collected was found infected naturally with *Plasmodium*. *Anopheles albimanus* could be the main malaria vector in the localities studied, due to the high densities found and its vector capacity recorded in Colombia. Possibly, *An. pseudopunctipennis* s.l. may play a role in malaria transmission if infected people were present and in areas with high mosquito densities found in this study showed that vector control strategies implemented in 2014-2015 by local health institutions with *Bacillus sphaericus* and insecticides are proving to be effective.

**Keywords:** Identification, *COI*, mosquito, paludismo, vectors

## INTRODUCCIÓN

La malaria continúa siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en países tropicales y subtropicales del mundo, se estima que alrededor de 3,3 billones de personas se encuentran en riesgo de contraerla (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2017). esta enfermedad es causada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmiten al humano a través de la picadura de mosquitos hembras infectadas del género *Anopheles* (World Health Organization [WHO], 2019). Ocho especies de *Plasmodium* spp. son las causantes de la malaria en los humanos, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi*, *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovalae*, *P. simium* y *P. vivax* (Brasil et al., 2017; Lourenço-de-Oliveira y Deane, 1995), siendo *P. falciparum* y *P. vivax* los más comunes.

En Colombia, durante el año 2019 se registraron 78.513 casos de malaria; Antioquia ocupó el cuarto lugar después de los departamentos de Chocó, Nariño y Córdoba, con 7076 casos, registrándose un aumento significativo con respecto al año 2018 donde se reportaron 5415 casos (Instituto Nacional de Salud [INS]-SIVIGILA, 2019).

El género *Anopheles* incluye 8 subgéneros y 472 especies descritas (CDC, 2017), de las cuales 41 son consideradas vectores de malaria en el mundo (Sinka et al., 2012). En Colombia hay presencia de cinco subgéneros (Harbach, 2018) y entre ellos hay aproximadamente 47 especies de *Anopheles* (González y Carrejo, 2009). Doce especies son consideradas vectores de malaria: *An. (Nys.) nuneztovari*, Gabaldon, 1940; *An. (Nys.) albimanus*, Wiedemann, 1920; *An. (Nys.) darlingi*, Root, 1926 (Herrera et

al., 1987; Montoya-Lerma et al., 2011; Olano et al., 2001), *An. (An.) pseudopunctipennis*, Theobald, 1901; *An. (Ker.) neivai*, Howard, Dyar y Knab, 1913; *An. (Nys.) rangeli* Gabaldon, Cova-García y López, 1940; *An. (An.) calderoni* Wilkerson, 1991; *An. (An.) neomaculipalpus* Curry, 1931; *An. (Nys.) oswaldoi* Peryassu, 1922; *An. (An.) punctimacula* Dyar y Knab 1906; *An. (Ker.) pholidotus* Zavortink, 1973, *An. (Nys.) benarrochi* (Harrison et al., 2012; Herrera et al., 1987; Olano et al., 2001; Orjuela et al., 2013; Quiñones et al., 2006; Rosero et al., 2013; Ruiz-López et al., 2012).

En Colombia, debido a estudios morfológicos y moleculares principalmente, las siguientes seis especies se consideran complejos de especies: *An. nuneztovari* (Conn et al., 1993; Foster et al., 2013; Mirabello y Conn, 2008; Scarpassa et al., 2016; Sierra et al., 2004), *An. oswaldoi* (Ruiz-López et al., 2013), *An. albitarsis* (Ruiz-Lopez et al., 2012; Wilkerson et al., 2005), *An. triannulatus* (Moreno et al., 2013; Silva-do-Nascimento et al., 2006), *An. pseudopunctipennis* (Coetzee et al., 1999; Estrada-Franco et al, 1993a, 1993b) y *An. benarrochi* (Ruiz-Lopez et al., 2012).

De acuerdo con la información suministrada por Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia [DSSA] (2001), en el departamento de Antioquia se registran 23 especies de *Anopheles*, la mayoría de ellas en Urabá, y Bajo Cauca. En el municipio de Turbo hay 13 especies registradas (González y Carrejo, 2009), de las cuales ocho especies son consideradas vectores (González y Carrejo, 2009). Además de la presencia de cuatro miembros de complejos de especies: *An. oswaldoi* s.l., *An. nuneztovari* s.l., *An. pseudopunctipennis* s.l. y *An. triannulatus* s.l. (González y Carrejo, 2009).

El objetivo de esta investigación fue determinar las especies de *Anopheles* spp. presentes en las áreas endémicas de transmisión de malaria en Turbo, Antioquia y evaluar su infección natural con *Plasmodium* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Zona de estudio y recolectas entomológicas de adultos

El estudio se realizó en la zona rural del municipio de Turbo, en las veredas El Olleto (8° 22' 03,5" N, 76° 32' 59,4" W) y La Isleta (8° 20' 37,4" N, 76° 33' 05,8" W) (figura 1). El muestreo entomológico consistió en cuatro recolectas realizadas cada tres meses, incluyendo temporadas secas y lluviosas (septiembre y noviembre de 2015; marzo y junio de 2016), tres días por cada vereda, en dos viviendas por día; cada vivienda se monitoreaba durante 4 horas, lo que significó un esfuerzo de muestreo de 96 horas. En cada recolecta, las capturas de mosquitos adultos se realizaron en el intradomicilio y peridomicilio, con cebo humano protegido, utilizando un aspirador bucal. Así mismo, se utilizaron trampas de luz tipo CDC, de las 18:00 a las 06:00 horas. Adicionalmente, entre las 18:00 y las 22:00 horas, se recolectaron mosquitos sobre animales de corral: ganado vacuno, cerdos y gallinas. Todos los mosquitos fueron sacrificados en frío, depositados de manera individual en tubos Eppendorf de 0,5 ml con la tapa perforada, guardados en bolsa hermética con sílica gel y rotulados con hora, fecha y sitio de recolecta, para posteriormente ser transportados al laboratorio del ICMT-CES.

### Recolectas entomológicas de estadios inmaduros y descripción de criaderos

Todos los criaderos (cuerpos de agua) ubicados alrededor de las viviendas, en un radio de 200 m, fueron georreferenciados. Se tomaron muestras con cucharones, diez cucharadas por cada m<sup>2</sup> de superficie, según la metodología de la WHO (1975). Esta actividad se realizó entre las 07:00 y las 10:00 horas. Además, cada cuerpo de agua (jagüey) fue clasificado según el tamaño en: pequeños (<10 m<sup>2</sup>), medianos (10-100 m<sup>2</sup>) y grandes (>100 m<sup>2</sup>). Las larvas recolectadas fueron depositadas en viales Eppendorf de

0,5 ml, en alcohol al 95 %, debidamente rotuladas y guardadas en bolsas selladas para ser transportadas al laboratorio del ICMT-CES.

### Identificación morfológica

Todos los ejemplares adultos y estados inmaduros recolectados se identificaron con las claves morfológicas disponibles para Colombia (Faran, 1980; Faran y Linthicum, 1981; González y Carrejo, 2009).

### Técnicas moleculares

Los mosquitos recolectados posterior a la identificación morfológica, fueron disectados en dos partes: el abdomen para la identificación molecular de cada organismo y la cabeza-tórax para evaluar infección natural con *Plasmodium* spp. (Álvarez et al., 2011; Ruiz-López et al., 2010). La extracción de ADN de los mosquitos que fueron identificados mediante el método de código de barras (*barcoding*), se realizó con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit disponible comercialmente (QIAGEN®, EE. UU.) usando el protocolo de tejido animal. La extracción de ADN para las pruebas de infectividad, se realizó con el protocolo de extracción de Chelex® (Murillo et al., 2019). El ADN extraído con ambas metodologías se almacenó a -20°C en el laboratorio hasta ser utilizado.

### PCR para la región COI

La amplificación del fragmento de 710 pb COI se realizó usando el par de cebadores LCO1490 y HCO2198, descritos por Folmer et al. (1994) y los parámetros y condiciones de la PCR descrita por Ruiz-Lopez et al. (2010). El producto de PCR se visualizó en gel de agarosa al 1 % con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio.

### PCR para infección natural con *Plasmodium* spp.

El material obtenido después de extracción, se amplificó mediante PCR anidada, usando los cebadores específicos del género *Plasmodium* (rPLU1 y rPLU5) y (rPLU3 y rPLU4), desarrollados por Snounou y Singh (Singh et al., 1999; Snounou et al., 1993), con las condiciones de PCR previamente estandarizadas (Gutiérrez et al., 2008; Monsalve-Restrepo, et al.,

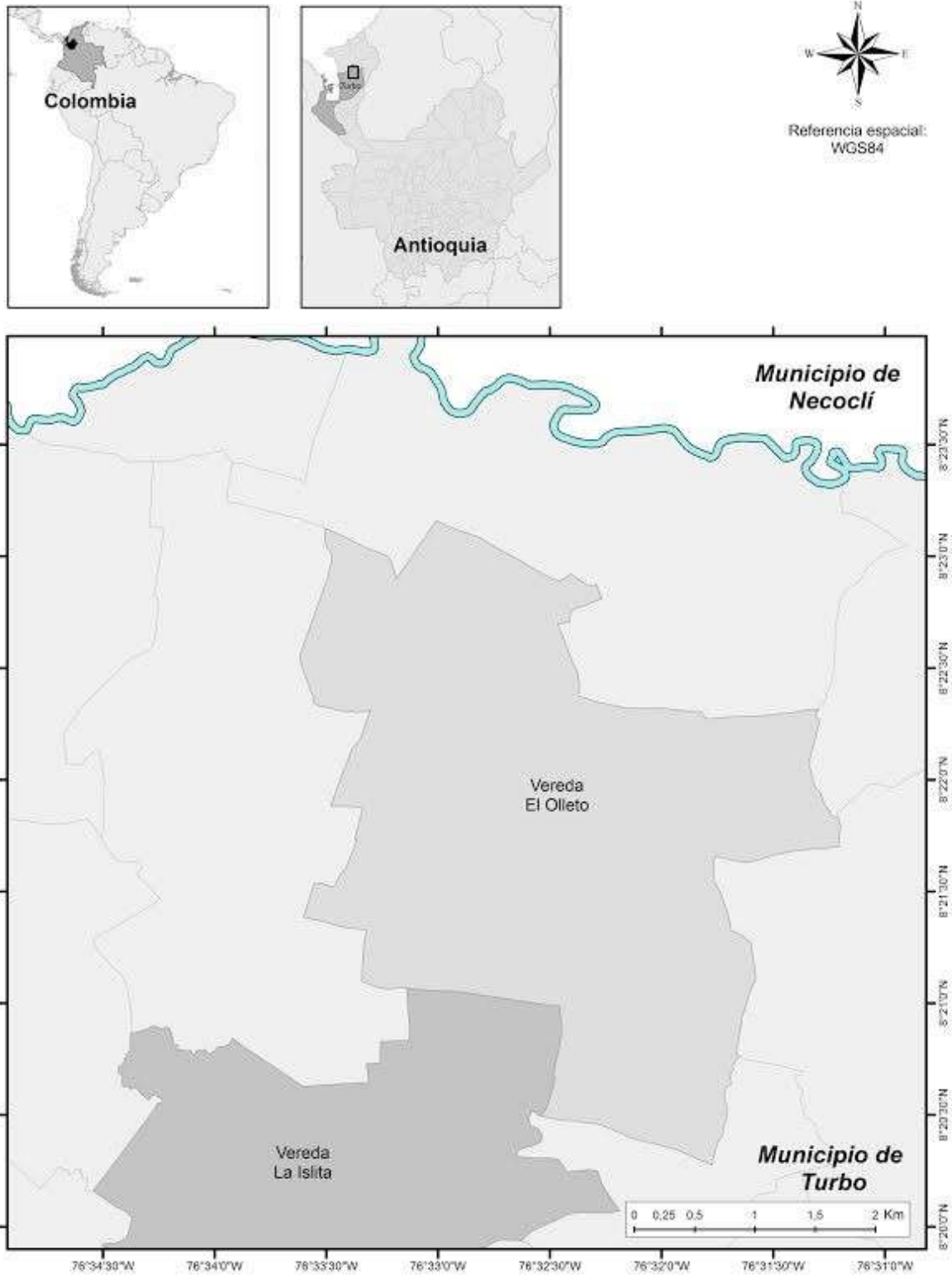


Figura 1. Zona de estudio, veredas El Olleto y La Islita, municipio de Turbo, Antioquia.

2011). El producto de PCR se visualizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con 0,5 mg/ml bromuro de etidio.

Las muestras se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen (Corea del Sur) en ambas direcciones. Los cromatogramas se editaron en Sequencher 5.2.4. Las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con las secuencias disponibles en GenBank, usando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la base de datos de BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org>). La diversidad de las secuencias encontradas en esta investigación, se calculó en MEGA 6.06, usando el modelo Kimura 2 Parámetros - K2P (Kimura, 1980). Con el fin de validar las identificaciones morfológicas de las especies recolectadas en esta investigación, se descargaron 240 secuencias de GenBank y se analizaron con las secuencias de esta investigación. Se generó un árbol de NeighborJoining - NJ (Saitou y Nei, 1987), usando un Bootstrap de 1000 pseudoréplicas; para dilucidar el estatus taxonómico de los complejos de especies encontradas vs secuencias en GenBank, se realizó un análisis Bayesiano en Geneious v. 10.0.9. ([www.geneious.com](http://www.geneious.com)) (Huelsenbeck y Ronquist, 2001).

## RESULTADOS

### Identificación morfológica de adultos

En total 121 especímenes fueron recolectados en el peridomicilio, en cebo humano protegido y en corrales de animales (vacas, cerdos y gallinas); no hubo recolectas en las trampas CDC (tabla 1). Se identificaron por morfología cuatro especies: *An. albimanus*, *An. triannulatus* s.l., *An. pseudopunctipennis* s.l. y *An. apicimacula* s.l. Tres de la cuales pertenecen a complejos de especies y su estatus taxonómico no se encuentra claramente definido (Harbach, 2013). La especie más abundante fue *An. albimanus* ( $n = 117$ , 96,7% del total de mosquitos identificados). Las otras tres especies presentaron muy bajas densidades: *An. pseudopunctipennis* s.l. ( $n = 2$ ), *An. triannulatus* s.l. ( $n = 1$ ) y *An. apicimacula* s.l. ( $n = 1$ ) (tabla 1).

La mayoría de los mosquitos adultos se recolectaron entre las 18:00 y las 19:00 horas, seguido de los

mosquitos recolectados durante las 19:00 y las 20:00 horas y las 20:00 y las 21:00 horas, respectivamente. *Anopheles albimanus* fue recolectado en las dos veredas de estudio, mientras que *An. triannulatus* s.l. y *An. apicimacula* s.l. solo fueron recolectados en una de las dos veredas evaluadas (tabla 2).

### Secuencias

#### COI

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

La distancia intraespecífica en *An. albimanus* fue de 0,004 ( $n = 28$ ; 21 haplotipos) y de *An. pseudopunctipennis* s.l. fue 0,076 ( $n = 2$ ). Debido al tamaño tan heterogéneo encontrado en las secuencias del GenBank, todas las secuencias se recortaron a un tamaño consenso de 516 pb. para su respectivo análisis (figura 2).

Las secuencias de esta investigación se compararon con las secuencias disponibles en el GenBank; *An. albimanus* y *An. triannulatus* s.l. mostraron una identidad de 98-99% con secuencias pertenecientes a mosquitos del departamento de Córdoba (Ahumada et al., 2016). *Anopheles pseudopunctipennis* s.l. mostró una identidad de 98% con secuencias de mosquitos del departamento de Córdoba (Herrera et al., 2014). Finalmente, *An. apicimacula* s.l. mostró una identidad 98-99% con secuencias del departamento de Córdoba y del municipio de Necoclí del Urabá antioqueño (Gómez et al., 2015) (figura 2).

### Recolección e identificación morfológica de inmaduros

Se recolectaron 65 larvas de anofelinos, que correspondieron a *An. albimanus* ( $n = 58$ ), *An. triannulatus* s.l. ( $n = 1$ ) y *An. apicimacula* s.l. ( $n = 6$ ).

En la vereda El Olleto se recolectaron 19 larvas, que correspondieron a *An. albimanus* ( $n = 18$ ) y *An. triannulatus* s.l. ( $n = 1$ ), y en la vereda La Islita, se recolectaron 46 larvas correspondientes a *An. albimanus* ( $n = 40$ ) y *An. apicimacula* s.l. ( $n = 6$ ). No se recolectaron larvas de *An. pseudopunctipennis* s.l. en ninguna de las veredas.

### Identificación de los sitios de cría para *Anopheles* spp.

En la vereda La Islita se encontraron siete jagüeyes (3 positivos) y en El Olleto cuatro (3 positivos), todos permanentes y creados por la comunidad para poder proveerse de agua, tanto para ellos como para los animales (figura 3). La profundidad máxima fue de 3 m y un área aproximada entre 50 - 200 m<sup>2</sup>.

**Tabla 1.** Porcentaje de las especies de *Anopheles* recolectadas e identificadas por morfología

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

**Tabla 2.** Especies de adultos de *Anopheles* spp. discriminadas por año y mes de recolecta

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

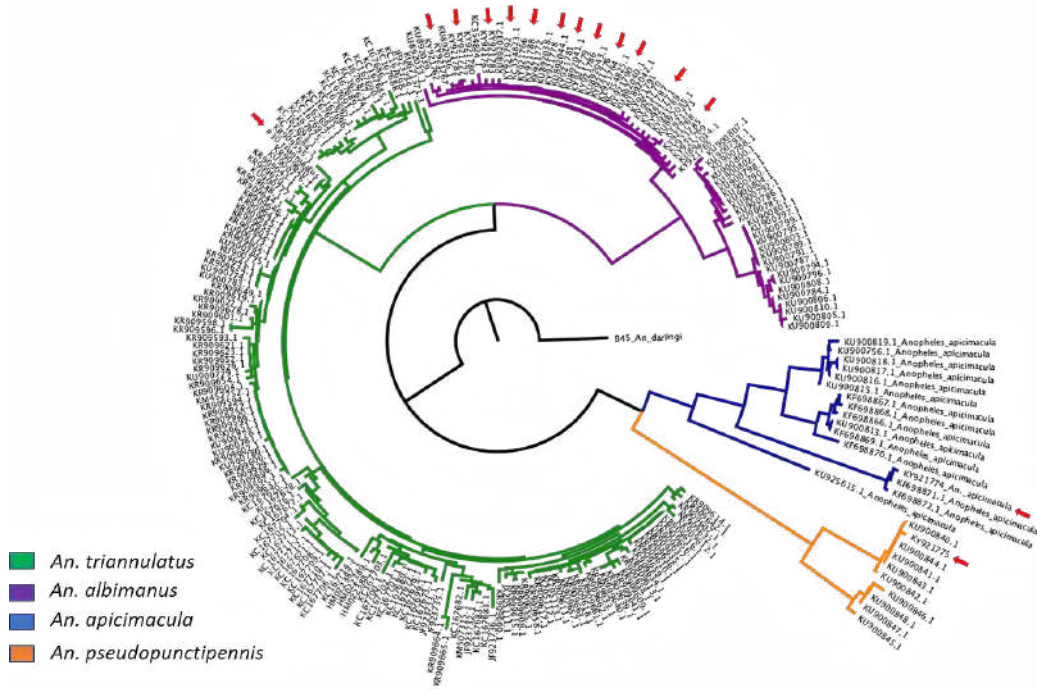


Figura 2. El árbol NJ-K2P está basado en secuencias propias y secuencias depositadas en el GenBank. Los valores inferiores al 70% no son mostrados. Las secuencias de GenBank se muestran con números de acceso. Todas las secuencias fueron recortadas a 658 pb.



Figura 3. Estanque (jagüey) en la vereda El Olleto, Turbo (Ant.).

Todos los estanques estaban expuestos al sol y tenían vegetación emergente de *Hydrilla* spp. o estaban cubiertos por hojarasca de la vegetación circundante (tabla 3); de los 11 jagüeyes, solo en seis, tres en cada vereda, se obtuvieron larvas de mosquitos.

### Infección natural con *Plasmodium* spp.

Ningún espécimen de los 121 mosquitos evaluados fue encontrado infectado con *Plasmodium* spp, en las veredas estudiadas.

## DISCUSIÓN

*Anopheles albimanus*, considerado uno de los principales vectores de malaria en la América (Scarpassa et al., 2016), posiblemente sea el responsable de la transmisión en las veredas estudiadas. Esta especie se registró en todos los meses de recolecta, siendo la más abundante en ambas veredas (96,6 %); las mayores densidades se presentaron en época de lluvia entre septiembre y noviembre, y se recolectó picando al hombre en el peridomicilio entre las 18:00-20:00 horas.

Algunos autores han demostrado la presencia de *An. albimanus* en altitudes bajas y áreas costeras, en criaderos de aguas salobres (Coetzee et al., 1999; Estrada-Franco et al., 1993; Niño et al., 2016); sin embargo, otras investigaciones han dado cuenta de la presencia de esta especie al interior del país, en altitudes superiores a las de las costas Atlántica y Pacífica (Linley et al., 1996), sugiriendo que esta

especie se puede adaptar a condiciones diferentes de las reportadas usualmente (Kitzmilller et al., 1973). Las localidades estudiadas en esta investigación se encuentran aproximadamente a 26 km del Océano Atlántico, confirmando los estudios anteriormente descritos; los criaderos encontrados fueron de aguas dulces, alejados de zonas costeras, utilizados para consumo humano y animal.

Con relación a *An. triannulatus*, aunque su importancia como vector en la transmisión de la malaria no es muy clara, esta es basada en la identificación de la proteína del circumsporozoíto de *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae* en hembras (Galardo et al., 2007; Sinka et al., 2010); sin embargo, en Colombia no se considera vector de malaria (Scarpassa et al., 1996) a pesar de haberse encontrado infectado en Antioquia y Córdoba (Naranjo-Díaz et al., 2013; Rosero et al., 2013). *Anopheles triannulatus* tiene hábitos antropofílicos (Peyton, 1993), alimentándose de las personas por fuera de las viviendas (Rubio-Palis, 2000); no obstante, otros estudios indican que esta especie tiene hábitos zoofílicos (Foster et al., 2013; Klein et al., 1991). En este estudio no se hallaron evidencias que puedan concluir su verdadero papel como vector en las veredas estudiadas.

*Anopheles pseudopunctipennis* es reconocido como uno de los principales vectores de malaria en América (Conn et al., 2002; Pova et al., 2006). En Colombia, se ha encontrado infectado con *Plasmodium*, siendo catalogado como vector local de malaria (Forattini, 1962). En estudios realizados en Brasil se ha esta-

**Tabla 3.** Parámetros de las características fisicoquímicas de los jagüeyes veredas El Olleto y La Islita

Localidad	Distancia a vivienda más cercana	Temperatura del agua (C°)	pH	Conductividad	Oxígeno disuelto	N° de larvas
El Olleto	210	32,2 a 34,1	8,43	157,3 us/cm	8,93 mg/L	5 <i>An. albimanus</i>
	100	32,2 a 32,6	7,91	150 us/cm	6,52 mg/L	10 <i>An. albimanus</i>
	80	25,8 a 32,1	7,66	155,8 us/cm	6,94 mg/L	3 <i>An. albimanus</i> , 1 <i>An. triannulatus</i>
La Islita	100	28,2 a 28,6	7,4	307 us/cm	7,29 mg/L	16 <i>An. albimanus</i> , 6 <i>An. apicimacula</i>
	50	33,3 a 34,1	7,4	259 us/cm	7,91 mg/L	6 <i>An. albimanus</i>
	85	35,9 a 36,2	7,6	165,3 us/cm	6,28 mg/L	18 <i>An. albimanus</i>



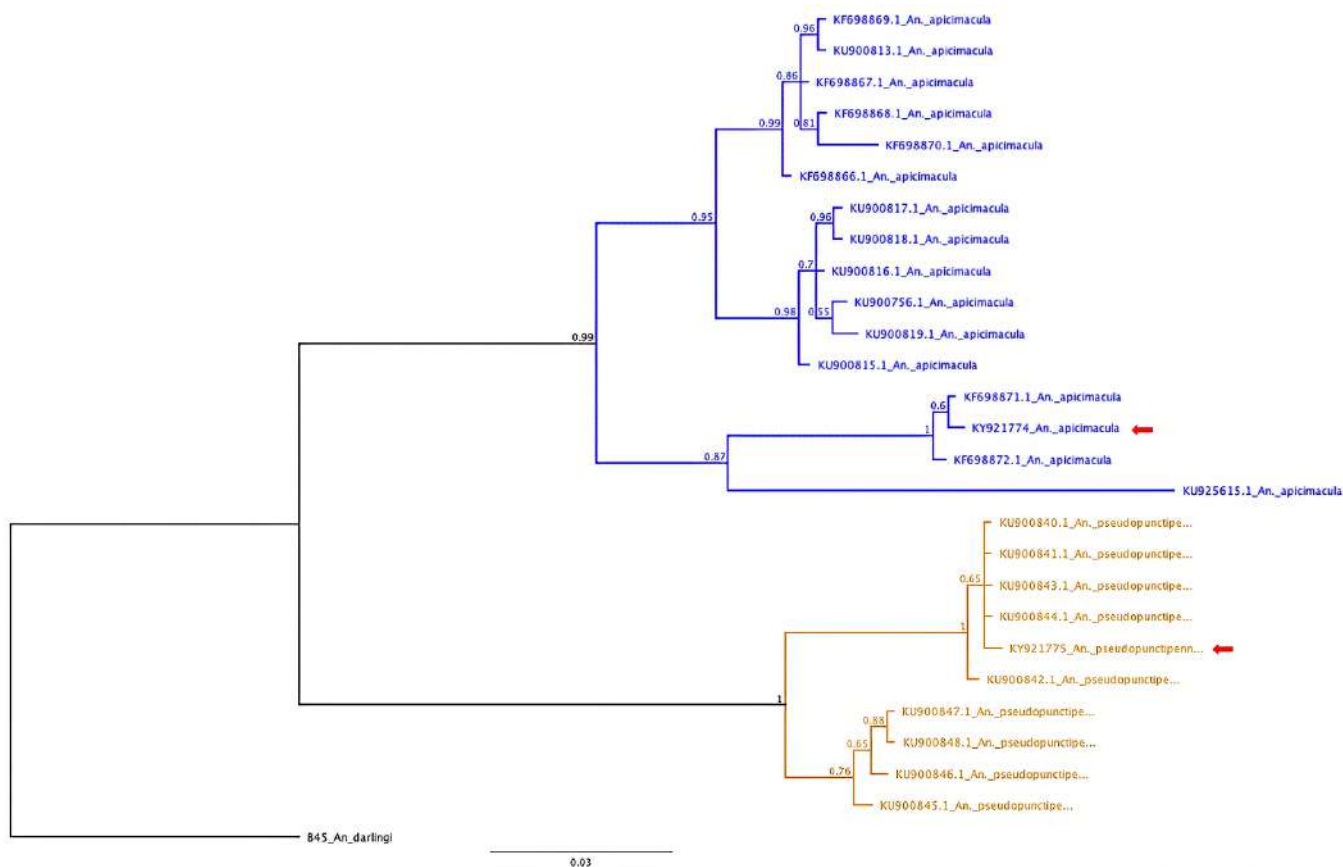
blecido que esta especie es de hábitos zoofílicos (Forattini, 1962). En estas localidades, las casas están cerca de los corrales de cerdos y ganado vacuno y las personas descansan fuera de las viviendas después de las actividades diarias, por lo que es posible que *An. pseudopunctipennis* se alimente sobre humanos en estas localidades de manera accidental.

*Anopheles apicimacula* s.l. no ha sido incriminado como vector de malaria en las Américas; en Puebla-México fue catalogado como sospechoso de la transmisión de malaria en el estudio de Martínez-Palacio (1960), citado en Rodríguez et al. (1996). Esta especie es catalogada por Fajardo y Barreto (1983) como muy zoofílico y, en lugares donde los animales domésticos son pocos, esta especie puede verse obligada a alimentarse de los humanos de manera accidental.

### Complejos de especies

Durante el desarrollo de este trabajo se encontraron cuatro especies de *Anopheles*: *An. albimanus*, *An. apicimacula* s.l., *An. triannulatus* s.l. y *An. pseudopunctipennis* s.l. De las especies recolectadas solo *An. albimanus* se considera una especie claramente definida taxonómicamente (Gutiérrez et al., 2009); las especies restantes hacen parte de complejos de especies, donde su estatus taxonómico no está correctamente definido (Harbach, 2013) (figuras 2 y 4).

Recientes estudios han demostrado que *An. triannulatus* es un complejo de especies formado por *An. triannulatus* s.s., *An. halophylus* y *An. triannulatus* C (Moreno et al., 2013). El espécimen recolectado en este estudio presentó las características morfológicas



**Figura 4.** Árbol de inferencia Bayesiana de *Anopheles apicimacula* y *An. pseudopunctipennis* encontrados en esta investigación (flechas rojas) y las secuencias presentes en el GenBank. Modelo evolutivo HKY85. Los números en los nodos corresponden a los valores de probabilidades posteriores. N = 26 únicos haplotipos. Se incluyó *An. darlingi* como grupo externo.

típicas de *An. triannulatus* s.s. en hembras adultas, reportado en las claves disponibles (González y Carrejo, 2009; Sallum et al., 2020); sin embargo, no podríamos decir que este es *An. triannulatus* s.s, debido a que no encontramos secuencias de las localidades tipo de estas especies en el GenBank para su comparación (figura 2). Este espécimen se alineó con secuencias procedentes de mosquitos del departamento de Córdoba, Colombia (Moreno et al. 2013). Como se puede observar, el estatus taxonómico de *An. triannulatus* no es claro para el país, sin embargo, hay evidencia que apunta que al noroccidente del país probablemente haya un grupo genéticamente relacionado con *An. triannulatus* s.s. (Rosero et al., 2012).

Actualmente se reconoce que *An. pseudopunctipennis* es un complejo de al menos tres especies A, B, C (considerando estudios con isoenzimas y citogenéticos). Los estudios que se han realizado en Colombia (Ahumada et al., 2016) no han concluido a qué especies del complejo pertenecen, solo se hace referencia que pertenecen a las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* s.l. del grupo norte o de la región del Pacífico Colombiano. El espécimen recolectado en esta investigación hace parte del grupo norte de Colombia, agrupándose con secuencias presentes en el GenBank de los departamentos de Córdoba y La Guajira-Colombia (Ahumada et al., 2016; Herrera-Varela et al., 2014) (figura 4). De acuerdo con los estudios que se han realizado en el país, en Colombia se encuentra *An. pseudopunctipennis* s.l. (Ahumada et al., 2016).

*Anopheles apicimacula* en Colombia abarca por lo menos dos especies, *An. apicimacula* linaje C, presente en el Caribe Colombiano y *An. apicimacula* P, del Pacífico Colombiano, reconocidos como linajes evolutivos independientes (Ahumada et al., 2016). El árbol de inferencia Bayesiana muestra cuatro clados de *An. apicimacula* s.l. (figura 4), uno de ellos en Buenaventura, otro en Nuquí-Buenaventura, uno más en Tumaco y el otro en la zona de Urabá. El espécimen hallado en esta investigación se agrupó con secuencias de mosquitos de la región de Urabá, *An. apicimacula* linaje C (Ahumada et al., 2016).

## Criaderos

El tamaño de los jagüeyes fue variable entre 50 - 200 m<sup>2</sup>, todos con producción larvaria muy homogénea; estos estanques tienen un objetivo en la comunidad, el cual es proveer de agua para el baño y dar de beber a los animales. Los jagüeyes presentan vegetación flotante lo que ayuda a convertir estos espacios como nichos protectores de larvas de *Anopheles* contra la depredación (González y Martínez, 2006). Otro factor determinante es que en los criaderos se encontraron insectos perteneciente los órdenes de Hemiptera (Noctonectidae) y Odonata, los cuales pueden actuar como depredadores de larvas de mosquitos (González, 2005; Hoyos et al., 2014) y estar desarrollando un control biológico importante en la zona.

En el caso de las especies encontradas en las dos localidades, la variación de las condiciones biológicas de cada estanque (tabla 3) pudo haber ocasionado competencia intraespecífica, manifestándose en la variación de densidades en los diferentes estanques evaluados (González, 2005). Es importante anotar que, la Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia, llevo a cabo un programa de prevención y control en las veredas conocido como “Papá Luis” aplicando *Bacillus sphaericus* en los jagüeyes y rociando insecticidas casa a casa, como medidas para disminuir el riesgo de contraer malaria; por lo anterior, futuros estudios serán necesarios para evaluar si las bajas densidades encontradas de *Anopheles* spp. están relacionadas con la implementación de este programa en la región.

## CONCLUSIONES

En este estudio se evidenció la presencia de cuatro especies de *Anopheles*: *An. albimanus*, *An. triannulatus* s.l., *An. pseudopunctipennis* s.l. y *An. apicimacula* s.l. *Anopheles albimanus* podría ser el principal vector de malaria en las localidades estudiadas, debido a sus densidades encontradas y su gran capacidad vectorial reportada en Colombia. Posiblemente, *An. pseudopunctipennis* s.l. puede jugar un papel en la transmisión de malaria en presencia de personas infectadas y con altas densidades.

Si las comunidades de estas regiones siguen desa-

rollando sus vidas en condiciones socioeconómicas precarias, como viviendas improvisadas, ausencia de acueducto y alcantarillado, viéndose en la obligación de construir jagüeyes, siempre va a existir el riesgo de contraer malaria, solo faltaría la presencia de personas infectadas (población migrante), para que se inicie un brote de malaria en la región.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del CES, al ICMT y al PECET por la financiación del estudio; a Enderson Ramos por sus ayudas y enseñanzas en las técnicas moleculares; a Giovanni Zapata por la ayuda en las salidas de campo; a doña Amparo, su familia y a la comunidad de la vereda El Olleto, por su hospitalidad y ayuda; a Ulises, su familia y la comunidad de la vereda La Islita, por compartir con nosotros sus días y noches; además, a todas las personas que no están consignadas aquí que, de una u otra manera, aportaron para que esta investigación se pudiera desarrollar.

## FINANCIACIÓN

Este estudio se pudo realizar, gracias a la financiación de la dirección de investigación e innovación de la Universidad CES, cuyo código del proyecto es INV0320150004.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores manifestamos no tener conflictos de intereses en esta publicación.

## REFERENCIAS

- Ahumada, M. L., Orjuela, L. I., Pareja, P. X., Conde, M., Cabarcas, D. M., Cubillos, E. F. G., López, J.A., Beir, J. C., Herrera, S., & Quiñones, M. L. (2016). Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria Journal*, 15, 407. DOI:10.1186/s12936-016-1421-4
- Álvarez, N., Rosero, D., Gómez, G., & Correa, M. (2011). Detección de mosquitos *Anopheles* infectados naturalmente con *Plasmodium* spp. en Puerto Libertador, Córdoba, Colombia. *Hechos Microbiológicos*, 2, 27-35. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/12647>
- Brasil, P., Zalis, M., Pina-Costa, A., Machado-Piqueira, M., Bianco-Junior, C., Silva, S., Lisboa-Areas, A.L., Pelajo-Machado, M., Madureira-de-Alvarenga, D.A., Faria-da-Silva-Santelli, A. C., Gomes-Albuquerque, H., Cravo, P., Vieira-Santos-de-Abreu, F., Lourenço-de-Oliveira, R., Ferreira-Alves-de-Brito, C., Ferreira-da-Cruz, M.F., Culleton, R., & Daniel-Ribeiro, C. T. (2017). *Plasmodium simium* causing human malaria: a zoonosis without-break potential in the Rio de Janeiro Brazilian Atlantic forest. *The Lancet Global Health*, 5(10), e1038-e1046. DOI:10.1016/S2214-109X(17)30333-9
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). Malaria. <https://www.cdc.gov/parasites/malaria/index.html>
- Coetzee, M., Estrada-Franco, J. G., Wunderlich, C. A., & Hunt, R. H. (1999). Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(4), 649-653. DOI:10.4269/ajtmh.1999.60.649
- Conn, J., Puertas, Y. R., & Seawright, J. A. (1993). A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9(3), 294-301. [https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA\\_V09\\_N3\\_P294-301.pdf](https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V09_N3_P294-301.pdf)
- Conn, J. E., Wilkerson, R., Segura, N., De Souza, R., Chlichting, C., Wirtz, R., & Povoia, M. (2002). Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in Land use. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66, 18-22. DOI:10.4269/ajtmh.2002.66.18
- Dirección Seccional de Salud de Antioquia. (2001). Mapas de distribución de *Anopheles* del departamento de Antioquia. Medellín: DSSA.
- Estrada-Franco, J. G., Ma, M. C., Gwadz, R. W., Sakai, R., Lanzaro, G. C., Laughinghouse, A., Galván-Sánchez, C., Céspedes, J. L., & Vargas-Sagarnaga, R. (1993a). Evidence through cross-mating experiments of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato: a primary malaria vector of the American continent. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 49, 746-755. DOI:10.4269/ajtmh.1993.49.746
- Estrada-Franco, J. G., Ma, M. C., Lanzaro, G. C., Gwadz, R., Galván-Sánchez, C., Céspedes, J. L., Vargas-Sagarnaga, R., & Rodríguez, R. (1993b). Genetic evidence of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 27(1), 26-31. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/27018>
- Fajardo, P., y Barreto, P. (1983) Anophelinos de Córdoba (Buenaventura, Colombia). *Colombia Médica*. 14, 99-103. <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/2444/2906>
- Faran, M. E. (1980). Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 15(7), 216. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Faran%201980.pdf>
- Faran, M., & Linthicum, K. (1981). A handbook of the

- Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 13(1), 1-81. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Faran%20%26%20Linthicum%201981.pdf>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, K. R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine and Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.
- Forattini, O. (1962). *Entomologia Medica*. Facultad de higiene e salud publica, 1, 662.
- Foster, P. G., Bergo, E. S., Bourke, B. P., Oliveira, T. M. P., Nagaki, S. S., Sant'Ana, D. C., & Sallum, M. A. M. (2013). Phylogenetic Analysis and DNA-based Species Confirmation in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). *PLoS ONE*, 8(2). DOI:10.1371/journal.pone.0054063
- Galardo, A., Arruda, M., Couto, A., Wirtz, R., Lounibos, L., & Zimmerman, R. H. (2007). Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 76(3), 461-469. DOI:10.4269/ajtmh.2007.76.
- Gómez, G., Bickersmith, Sara., González, R., Conn, J. E., & Correa, M. (2015). Molecular Taxonomy Provides New Insights into *Anopheles* Species of the Neotropical Arribalzagia Series. *PLoS ONE*, e0119488. DOI:10.1371/journal.pone.0119488
- González, R., & Carrejo, N. (Eds.) (2009). *Introducción al estudio taxonómico de Anopheles de Colombia: claves y notas de distribución*. Programa Editorial Universidad de Valle. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/18842>
- González, R., & Martínez, L. M. (2006). Nuevo registro de distribución altitudinal de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera:culicidae). *Boletín Museo Entomológico Universidad del Valle*, 7, 19-23. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/handle/10893/748/VOL.%207%2C%20No%2C%202%20p.%2019-23%2C%202007.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González, R. (2005). Efecto del criadero sobre la duración del ciclo de vida y productividad de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). *Boletín Museo Entomológico Universidad del Valle*, 6(1), 1-6. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/734>
- Gutiérrez, L. A., Naranjo, N., Jaramillo, L. M., Muskus, C., Luckhart, S., Conn, J. E., & Correa, M. M. (2008). Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*, 107(2), 99-105. DOI:10.1016/j.actatropica.2008.04.019
- Gutiérrez, L. A., Naranjo, N. J., Cienfuegos, A. V., Muskus, C. E., Luckhart, S., Conn, J. E., & Correa, M. M. (2009). Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria Journal*, 8, 259. DOI:10.1186/1475-2875-8-259
- Harbach, R. E. (2013). The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. In S. Manguin (Ed.), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors* (pp. 1-55). DOI:10.5772/54695
- Harbach, R. E. (2018). An *Anopheles* by Any Other Name? *Journal of Medical Entomology*, 55(5), 1069-1070. DOI:10.1093/jme/tjy108
- Harrison, B. A., Ruiz-López, F., Falero, G. C., Savage, H. M., Pecor, J. E., & Wilkerson, R. C. (2012). *Anopheles* (*Kerteszia*) *lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*, 1(3218), 1-17. DOI:10.5281/zenodo.211343
- Herrera-Varela, M., Orjuela, L., Peñalver, S., Conn, J. E., & Quiñones, M. (2014). *Anopheles* species composition explains differences in *Plasmodium* transmission in La Guajira, northern Colombia. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7), 955-959. DOI:10.1590/0074-02761401261-5.
- Herrera, S., Suárez, M. F., Sánchez, G. I., Quiñones, M. L., & Herrera, M. (1987). Uso de la técnica inmunoradiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoitos de *Plasmodium*. *Colombia Médica*, 18, 2-6. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-81532?lang=es>
- Hoyos, R., Graciano, S., & Ríos, J. (2014). Evaluación del notonéctido como control biológico de larvas de *Aedes aegypti*. *Revista Ciencias Ambientales y Sostenibilidad CAS*, 1, 4-14. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/CAA/article/view/15304>
- Huelsenbeck, J., & Ronquist, F. (2001). Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755. DOI:10.1093/bioinformatics/17.8.754 pmid:11524383
- Instituto Nacional de Salud -SIVIGILA. (2019). Casos totales de malaria en la semana epidemiológica 52 y acumulados del año. Bogotá. [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019\\_Boletin\\_epidemiologico\\_semana\\_52.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_52.pdf)
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120. DOI:10.1007/bf01731581
- Kitzmler, J., Kreutzer, R., & Tallaferro, E. (1973). Chromosomal differences in populations of *Anopheles nuneztovari*. *Bulletin of the World Health Organization*, 48(4), 435-445. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2481113/pdf/bullwho00177-0055.pdf>
- Klein, T., Lima, J., & Tada, M. (1991). Comparative Susceptibility of Anopheline Mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(6), 598-603. DOI:10.4269/ajtmh.1991.44.598
- Linley, J., Lounibos, L., Conn, J. E., Duzak, D., & Nishimura, N. (1996). A description and morphometric comparison of eggs from eight geographic populations of the South American malaria vector *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(2), 275-292.
- Lourenço-de-Oliveira, R., & Deane, L. M. (1995). Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 90(3), 331-339. DOI:10.1590/S0074-02761995000300004
- Mirabello, L., & Conn, J. E. (2008). Population analysis using

- the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(2), 109-119. DOI:10.1111/j.1365-2915.2008.00731.x
- Monsalve-Restrepo, M., Ortega-Arellano, H., Gutiérrez, L., Correa, M., & Zapata, M. A. (2011). Comparación de dos protocolos de extracción de ADN para la detección de infección por *Plasmodium* spp. en *Anopheles* spp. *Hechos Microbiológicos*, 2, 41-49.
- Montoya-Lerma, J., Solarte, Y. A., Giraldo-Calderón, G. I., Quiñones, M. L., Ruiz-López, F., Wilkerson, R. C., & González, R. (2011). Malaria vector species in Colombia: A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(Suppl. 1), 223-238. DOI:10.1590/S0074-02762011000900028
- Moreno, M., Bickersmith, S., Harlow, W., Hildebrandt, J., McKeon, S. N., Silva-do-Nascimento, T. F., Loaiza, J. R., Ruiz, F., Lourenço-de-Oliveira, R., Sallum, M.A.M., Bergo, E. S., Fritz, G. N., Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., Juri, M. J. D., Rangel, Y., Póvoa, M. M., Gutiérrez-Builes, L.A., Correa, M. M., & Conn, J. E. (2013). Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. *Parasites & Vectors*, 6(1), 47. DOI:10.1186/1756-3305-6-4
- Murillo, E., Muskus, C., Agudelo, L. A., Vélez, I. D., & Ruiz-Lopez, F. (2019). A new high-resolution melting analysis for the detection and identification of *Plasmodium* in human and *Anopheles* vectors of malaria. *Scientific Reports*, 9, 1674. DOI:10.1038/s41598-018-36515-9
- Naranjo-Díaz, N., Rosero, D., Rúa-Uribe, G., Luckhart, S., & Correa, M. (2013). Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary colombian malaria endemic area. *Parasites & Vector*, 6, 61. <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/61>
- Niño, C. H., Cubides, J. R., Camargo-Ayala, P. A., Rodríguez-Celis, C. A., Quiñones, T., Cortés-Castillo, M. T., Sánchez-Suárez, L., Sánchez, R., Patarroyo, M. E., & Patarroyo, M. A. (2016). *Plasmodium malariae* in the Colombian Amazon region: you don't diagnose what you don't suspect. *Malaria Journal*, 15, 576. DOI:10.1186/s12936-016-1629-3
- Olano, V. A., Brochero, H. L., Sáenz, R., Quiñones, M. L., & Molina, J. (2001). Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomedica*, 21, 402-408. <https://www.redalyc.org/pdf/843/84321415.pdf>
- Orjuela, L. I., Herrera, M., Erazo, H., & Quiñones, M. L. (2013). Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con *Plasmodium*. *Biomédica*, 33, 42-52. DOI:10.7705/biomedica.v33i1.619
- Peyton, E. (1993). *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami*, resurrected from synonymy with *nuneztovari* and validated as a senior synonym of *Anopheles trinkae* (Diptera: Culicidae), *Mosquito systematics*, 25(3), 151-156. [https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MS\\_V25\\_N3\\_P151-156.pdf](https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MS_V25_N3_P151-156.pdf)
- Póvoa, M., De Souza, R., Lacerda, R. N., Rodriguez de Souza, J., Wirtz, R., Schlichting, C., & Conn, J. E. (2006). The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(2), 163-168. DOI:10.1590/S0074-02762006000200008
- Quiñones, M., Ruiz, F., Calle, D., Harbach, R., Erazo, H., & Linton, Y. (2006). Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(6), 617-623. DOI:10.1590/S0074-02762006000600000
- Rodríguez, M.H, Chávez, B., Orozco, A., & Martínez-Palomo, A. (1996). Fine structure of the eggs of *Anopheles (Anopheles) apicimacula* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(3), 454-459. [https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA\\_V12\\_N3\\_P454-459.pdf](https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V12_N3_P454-459.pdf)
- Rosero, D., Naranjo-Díaz, N., Álvarez, N., Cienfuegos, A., Torres, C., Luckhart, S., & Correa, M. (2013). Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) naturally infected with *Plasmodium* spp. *ISNR Parasitology*, 927453. DOI:10.5402/2013/927453
- Rubio-Palis, Y. (2000). *Anopheles (Nyssorhynchus) de Venezuela, Taxonomía, Bionomía, Ecología e importancia médica*. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Amoldo Gabaldon" y el Proyecto Control de Enfermedades Endémicas. Maracay, Venezuela. <https://www.yumpu.com/es/document/read/16285394/anopheles-nyssorhynchus-de-venezuela-taxonomia-bionomia>
- Ruiz, F., Linton, Y. M., Ponsonby, D. J., Conn, J. E., Herrera, M., Quiñones, M. L., Vélez, I. D., & Wilkerson, R. C. (2010). Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(7), 899-903. DOI:10.1590/S0074-02762010000700010
- Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R. C., Conn, J. E., McKeon, S. N., Levin, D. M., Quiñones, M. L., Póvoa, M. M., & Linton, Y. M. (2012). DNA *barcoding* reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5. DOI:10.1186/1756-3305-5-44
- Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R. C., Ponsonby, D. J., Herrera, M., Sallum, M. A. M., Velez, I. D., Quiñones, M. L., Flores-Mendoza, C., Chadee, D. D., Alarcon, J., Alarcon-Ormasa, J., & Linton, Y.M (2013). Systematics of the *Oswaldoi* Complex (*Anopheles, Nyssorhynchus*) in South America. *Parasites & Vectors*, 6(1), 324. DOI:10.1186/1756-3305-6-324
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425. DOI:0737-4038/87/0404-000702.00
- Sallum, M. A. M., González, R., Carrejo, N. S., & Wilkerson, R. (2020). Identification keys to the *Anopheles* mosquitoes of South America (Diptera: Culicidae). IV. Adult females. *Parasites & Vectors*, 13, 2-14. DOI:10.1186/s13071-020-04301-0
- Scarpassa, M., Tadei, P., & Suárez, M. F. (1996). Allozyme differentiation among allopatric populations

- of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 19(2), 265-269. <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/64800/2-s2.0-0029955858.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Scarpassa, V. M., Cunha-Machado, A. S., & Saraiva, J. F. (2016). Evidence of new species for malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato in the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal*, 15, 205. DOI:10.1186/s12936-016-1217-6
- Sierra, D. M., Vélez, I. D., & Linton, Y.M. (2004). Malaria vector *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* comprises one genetic species in Colombia based on homogeneity of nuclear ITS2 rDNA. *Journal of Medical Entomology*, 41(3), 302-307. DOI:10.1603/0022-2585-41.3.302
- Silva-do-Nascimento, T. F., Wilkerson, R. C., & Monteiro, F. A. (2006). Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in Central Brazil. *Journal Medical Entomology*, 43(3), 455-459. DOI:10.1603/0022-2585(2006)43[455:MCOTSS]2.0.CO;2
- Singh, B., Bobobare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Shukri, M., & Rahman, H. (1999). A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 687-692. DOI:10.4269/ajtmh.1999.60.687
- Sinka, M. E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Van Boeckel, T., Kabaria, C. W., Harbach, R. E., & Hay, S. I. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*, 3,72. DOI:10.1186/1756-3305-3-117
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Burkot, T. R., Harbach, R. E., & Hay, S. I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5,69. DOI:10.1186/1756-3305-5-69
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S., & Brown, K. N. (1993). Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58(2), 283-292. DOI:10.1016/0166-6851(93)90050-8
- Wilkerson, R. C., Foster, P. G., Li, C., & Mureb Sallum, M. A. (2005). Molecular phylogeny of Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* species complex (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98(6), 918-925. DOI:10.1603/0013-8746(2005)098[0918:mponan]2.0.co;2
- World Health Organization (1975). Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and techniques. *Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and Techniques*, 6-191. World Health Organization. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42481/WHO-OFFSET\\_13\\_\(part2\).pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42481/WHO-OFFSET_13_(part2).pdf)
- World Health Organization (2019). *World report malaria*. <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789241565721-eng.0.pdf>