

Confirmación molecular de especie en especímenes *Anopheles* recolectados en el corregimiento de Juan José, Puerto Libertador, Córdoba, Colombia

Molecular confirmation of the species on *Anopheles* specimens
collected in Juan Jose, Puerto Libertador, Cordoba, Colombia

Juliana Sánchez*, Yadira Galeano*, Doris A. Rosero†, Nelson J. Naranjo‡, Margarita M. Correa§

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La dificultad en la identificación morfológica de las hembras de varias especies del subgénero *Nyssorhynchus* ha sido documentada y se debe a la similitud morfológica interespecie, variación intraespecífica y la existencia de especies crípticas. Por ello, se han utilizado pruebas moleculares como la PCR-RFLP-ITS2, que permiten confirmar la identidad de las especies presentes en regiones endémicas.

OBJETIVO

Confirmar la identificación de mosquitos del género *Anopheles* recolectados en Juan José, Puerto Libertador, Córdoba, como aporte a un inventario de especies en la localidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

De 2.070 hembras de *Anopheles* identificados por caracteres morfológicos, 513 (24,8%) se confirmaron molecularmente mediante una PCR-RFLP-ITS2.

RESULTADOS

Las especies identificadas por morfología presentes en Juan José fueron: *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* s.l. Gabaldon (97,44%), *Anopheles (Nys.) darlingi* Root (0,77%) y *Anopheles (Nys.) oswaldoi* s.l. Peryassu (0,10%); el resto de especímenes (1,69%) se definieron como pertenecientes a una de las especies del grupo Oswaldoi. La confirmación molecular permitió determinar la presencia de sólo dos especies entre los especímenes analizados, 99,23% *A. (Nys.) nuneztovari* s.l. y 0,77% *A. (Nys.) darlingi*.

CONCLUSIÓN

Las dos especies de *Anopheles* encontradas en Juan José, durante el muestreo, son consideradas vectores primarios en Colombia; esta información es importante para dirigir los esfuerzos de control vectorial. Adicionalmente, los resultados reiteran previos reportes sobre la dificultad en la identificación morfológica de *A. nuneztovari* s.l. y la importancia de utilizar pruebas moleculares en su confirmación de especie.

PALABRAS CLAVES

Anopheles. Colombia. Malaria. Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Vectores de enfermedades.

*Estudiante de Microbiología y Bioanálisis, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. †Microbióloga y Bioanalista, Estudiante de Maestría en Biología, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Biólogo, Estudiante de Doctorado en Biología, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. §Ph. D. en Microbiología, Docente, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. *Estos autores tuvieron igual participación en el estudio. Contactos: mcorrea@quimbaya.udea.edu.co
Recepción: 08-08-2011. Aceptación: 08-09-2011.

SUMMARY

INTRODUCTION

Difficulty in the morphological identification of females of various species on the *Nyssorhynchus* subgenus has been documented; it is due to interspecies morphological similarity, intraspecific variation and the existence of cryptic species. For this reason, molecular techniques such as PCR-RFLP-ITS2 has been used, they allow confirming species assignation in endemic areas.

OBJECTIVE

To confirm the species assignation of mosquitoes *Anopheles* collected in Juan Jose locality, municipality of Puerto Libertador, Cordoba, as a contribution to a species inventory in the locality.

MATERIALS AND METHODS

Of 2.070 specimens identified by morphological characters, 513 (24.8%) were molecularly confirmed by PCR-RFLP-ITS2.

RESULTS

The species defined by morphology as present in Juan José were: *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* s.l. Gabaldon (97.44%), *A. (Nys.) darlingi* Root (0.77%) y *A. (Nys.) oswaldoi* s.l. Peryassu (0.10%). The rest of specimens (1.69%) were defined as belonging to one of the species of the Oswaldoi group. Molecular confirmation helped to determine the presence of only two species among the analyzed specimens, 99.23% *A. (Nys.) nuneztovari* and 0.77% *A. (Nys.) darlingi*.

CONCLUSIONS

The two species of *Anopheles* found in Juan Jose, during the sampling period are considered primary vectors in Colombia; this information is important to guide vector control efforts. Additionally, the results reaffirm previous reports on the difficulty of identifying *A. nuneztovari* s.l. by morphology and the importance of using molecular tests for species confirmation.

KEY WORDS

Anopheles. Colombia. Disease Vectors. Malaria. Polymerase Chain Reaction. Restriction Fragment Length Polymorphism.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* spp. y se transmite por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*.¹ Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2008, la mitad de la población mundial (3,3 billones) vive en áreas que tienen algún riesgo de transmisión del parásito y un quinto de ella (1,3 billones), reside en lugares con alta transmisión.² En Colombia, el 85% de las zonas rurales ubicadas por debajo de los 1.600 metros sobre el nivel del mar, cuenta con las condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas propicias para la transmisión de la enfermedad.³ Para el 2010, en el país se reportaron 116.914 casos de malaria⁴ y Córdoba es uno de los departamentos que aporta el mayor número de ellos; en el período 2001-2007, se presentaron en promedio 34.973 casos. Puerto Libertador fue uno de los municipios con más episodios reportados, 29% del total.⁵ En dicho departamento, como en otras áreas endémicas de Colombia, la malaria constituye un serio problema de salud pública,³ lo que demanda la implementación de medidas efectivas para el control de la enfermedad; una de ellas es el control de vectores, que ha probado ser una estrategia muy efectiva, pero para su implementación es importante tener un conocimiento de cuáles son las especies involucradas en la transmisión.⁶

En nuestro país, se han registrado aproximadamente 47 especies de *Anopheles*; nueve de estas son consideradas vectores de la enfermedad.⁷⁻⁹ Algunas de estas especies pertenecen al grupo Oswaldoi: *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* s.l. Gabaldon, *Anopheles (Nys.) oswaldoi* s.l. Peryassu y *Anopheles (Nys.) rangeli* Gabaldon, Cova García & López, que se caracteriza por presentar serios inconvenientes durante la identificación de las hembras adultas, debido a la existencia de especies crípticas, de la similitud morfológica interespecie y variación intraespecie.¹⁰⁻¹² El problema se observa al medir las manchas claras y oscuras de las alas o el tarsómero dos de la pata posterior de estos especímenes, al obtenerse rangos que pueden sobrelaparse o coincidir entre diferentes especies, como sucede entre *A. nuneztovari* s.l. y *A. rangeli*, o entre *A. nuneztovari* s.l. y *A. oswaldoi* s.l.^{13,14} Por lo anterior, y para lograr una correcta identificación de las especies problemáticas de *Anopheles*, se han empleado varias estrategias, como el análisis morfológico de estados inmaduros del

mosquito,¹³ los huevos, la quetotaxia de las larvas de cuarto estado,¹⁵ y la observación de la genitalia de machos.¹⁶ Para la identificación de especímenes del grupo Oswaldoi, se ha utilizado la morfología geométrica, la cual permite asignar un individuo a un grupo determinado o especie más probable, mediante análisis estadísticos de puntos anatómicos.¹⁷ En los últimos años, se han implementado pruebas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR;¹⁸⁻²⁰ entre estas, una metodología que ha demostrado ser efectiva y sencilla, es una PCR-RFLP (Longitud de los Fragmentos de Restricción-RFLP), que posibilita la confirmación de la identificación de varias especies de mosquitos del género *Anopheles*.²¹⁻²³ La estrategia de PCR-RFLP diseñada por Zapata *et al.*²¹ y complementada por Cienfuegos *et al.*,²² se basa en la amplificación del Espaciador Interno Transcripto 2 (Internal Transcribed Spacer 2-ITS2) del ADN ribosomal (ADNr) y su posterior digestión con la enzima de restricción *AluI*. La región ITS2 se localiza entre los genes que codifican para las subunidades ribosomales 28S y 5,8S, es una región no codificante que presenta una tasa más alta de mutación que los demás genes transcritos del ADNr, y varía genéticamente entre miembros de diferentes especies, pero es muy conservada dentro de la misma especie,²⁴ lo que la hace un buen marcador para la diferenciación de especies y para resolver problemas taxonómicos; sin embargo, el análisis de secuencias ITS2 tiene poca utilidad en la realización de interpretaciones filogenéticas.²⁵

Varios estudios han demostrado la utilidad de la PCR-RFLP y la fortaleza del marcador ITS2 para la identificación de especies anofelinas. Garros *et al.*,²⁶ implementaron una PCR-RFLP-ITS2 utilizando la enzima de restricción *BstZI* para la discriminación de 13 especies pertenecientes a los grupos *A. (Cellia) minimus* Chen y *A. (Cellia) funestus* Garros, distribuidos en África y Asia, respectivamente. En Latinoamérica, los estudios que han reportado el uso de esta metodología, ampliaron el conocimiento sobre las especies presentes en regiones endémicas para malaria, en varios países. Matson *et al.*,²³ diseñaron una PCR-RFLP-ITS2 utilizando una doble digestión con las enzimas *AluI* y *BvuBI* o con *AluI* y *FspI*, que permitió diferenciar nueve especies recolectadas en el Amazonas peruano, entre ellas: *A. (Nys.) benarrochi* Gabaldon, *A. darlingi* y *A. numeztovari* s.l. En Colombia, Ruiz *et al.*²⁷ lograron diferenciar *A. benarrochi* y *A. oswaldoi* s.l. mediante el

uso de esta metodología y la enzima *HaeIII*. La PCR-RFLP-ITS2 desarrollada por Zapata *et al.*,²¹ utiliza la enzima *AluI* y sirvió para diferenciar siete especies de *Anopheles* recolectados en San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia. Posteriormente, Cienfuegos *et al.*,²² emplearon herramientas bioinformáticas para diseñar una PCR-RFLP *in silico* que permitiera la confirmación de especies del grupo Oswaldoi²² no incluidas en la estrategia desarrollada por Zapata *et al.*²¹ y evaluaron esta PCR-RFLP en localidades de la Costa Pacífica colombiana, Costa Atlántica, Urabá, Bajo Cauca y Alto Sinú;²⁸ dicho trabajo permitió confirmar la utilidad de la prueba para la diferenciación de especies anofelinas en localidades diferentes a San Pedro de Urabá, al demostrar que los patrones encontrados para cada especie eran estables a través de todo el rango geográfico evaluado. Los resultados de los trabajos mencionados han corroborado la importancia de confirmar la identificación de las especies problemáticas; todos ellos sugieren que en el caso de estas especies, se debe recurrir a estrategias y herramientas como las moleculares, las que permitirán obtener resultados confiables en los diversos estudios de anofelinos, sean estos de tipo taxonómico, inventarios de especies, o de incriminación vectorial; su contribución a la correcta identificación de los especímenes, es esencial para que las conclusiones obtenidas en dichos trabajos sean válidas.

En las áreas endémicas para malaria en Colombia sería importante realizar un inventario actualizado de las especies presentes y la determinación de su infectividad natural, para obtener información sobre los vectores que están participando en la transmisión local y regional.⁶ El presente trabajo, hace parte de un macroproyecto dirigido a determinar las especies presentes y su infectividad natural, en dos zonas endémicas del noroccidente de Colombia. En él, se utiliza una estrategia de PCR-RFLP-ITS2^{21, 22} para verificar la asignación de especie de hembras del género *Anopheles* previamente identificadas por morfología, recolectadas en la localidad de Juan José, Puerto Libertador, departamento de Córdoba. Los resultados contribuyen al conocimiento de las especies presentes en dicha localidad, caracterizada por exhibir altos índices de malaria, y apoyarán la realización de trabajos complementarios, como la determinación de infectividad natural en los especímenes, para establecer qué especies están involucradas en la transmisión; ésta in-

formación contribuirá al adecuado direccionamiento de los esfuerzos de control vectorial en la localidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITOS

Los especímenes analizados se recolectaron en cebo humano (siguiendo un protocolo y consentimiento informado a los colectores, aprobado por el Comité de Bioética de la SIU, Universidad de Antioquia), entre las 18:00-24:00 horas, con una jornada de 18:00 a 6:00 horas, tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio. La recolección la realizaron integrantes del Grupo de Microbiología Molecular de la Universidad de Antioquia, en el corregimiento Juan José, Puerto Libertador, Córdoba (N 07°44'18,6-W75°51'20,3"), entre el 31 de julio y el 5 de agosto de 2009. Los 2.070 especímenes recolectados contaban con los siguientes soportes: identificación morfológica por claves disponibles,²⁹⁻³¹ disección para separar las patas, alas y abdómenes, los cuales fueron conservados en viales con etanol al 95%, y la cabeza y tórax preservados en sílica. Para el soporte entomológico, se realizó montaje en lámina-laminilla de las alas y pata posterior de un 5% de los especímenes reportados como *A. nuneztovari* s.l. (2.017), de todos los identificados como *A. darlingi* (16), los especímenes cuya identificación por morfología no pudo ser definida con certeza (35) y a los identificados como *A. oswaldoi* (2).

EXTRACCIÓN DEL ADN, AMPLIFICACIÓN Y DIGESTIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

El cálculo del tamaño de muestra para la confirmación molecular de los especímenes se realizó con base en una población finita, a partir de un n de 2.070 especímenes, con una seguridad del 95% (α : 0,05), obteniéndose un n de 513.³² Ésta muestra incluyó todos los especímenes *A. darlingi*, los que no pudieron identificarse con certeza y el n se completó con los identificados como *A. nuneztovari* s.l. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de abdómenes individuales, utilizando un protocolo de precipitación salina, modificado en el Grupo de Microbiología Molecular.³³ La PCR-RFLP-ITS2 se realizó siguiendo las condiciones referidas en los protocolos estandarizados por el laboratorio,^{21, 22} brevemente: la amplificación de la región ITS2 se efectuó con 2 μ L del ADN

genómico obtenido del abdomen de cada mosquito, empleando los oligonucleótidos que hibridan en las secuencias de ADN que codifican para las subunidades ribosomales 28S y 5,8S,³⁴ en una reacción final de 25 μ L, que se corrió en un termociclador iCycler (BioRad Hercules, California, EUA). El producto de amplificación fue digerido con la enzima *AluI* (Promega Corporation, Madison, EUA), la reacción se incubó a 37°C, durante mínimo cuatro horas y máximo una noche. Los productos de la PCR-RFLP-ITS2 se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (5 μ g/mL), en un transiluminador UV Transilluminator 2.000, (BioRad). Como controles positivos de la PCR-RFLP, se utilizaron clones de ITS2 provenientes de especímenes que contaban con el respaldo morfológico de isofamilias y series.^{21, 22}

RESULTADOS

DATOS DE LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

De los 2.070 especímenes recolectados en Juan José, la especie más abundante fue *A. nuneztovari* s.l. (97,44%); 0,77% de los especímenes fueron *A. darlingi*, dos mosquitos se identificaron morfológicamente como *A. oswaldoi* s.l. (0,10%) y a un pequeño porcentaje de los especímenes (1,69%), no se les pudo definir con exactitud su estatus taxonómico, dado que siguiendo las claves morfológicas se observaba solapamiento de los caracteres entre dos o tres especies de las pertenecientes al Grupo Oswaldoi, principalmente en las relaciones morfométricas de las manchas de las alas y del segundo tarsómero de la pata posterior. Es así, como 25 especímenes se registraron como posibles *A. nuneztovari* s.l. o *A. oswaldoi* s.l. (1,21%), nueve como *A. nuneztovari* s.l. o *A. rangeli* (0,43%) y un mosquito como *A. nuneztovari* s.l., *A. rangeli* o *A. oswaldoi* s.l. (0,05%) (tabla 1).

CONFIRMACIÓN MOLECULAR

De 513 especímenes procesados por PCR-RFLP-ITS2, el 22,8% (460), previamente identificados como *A. nuneztovari* s.l. por taxonomía clásica, fueron confirmados como tal, por PCR-RFLP. Los especímenes con identificación indefinida, designados por morfología como pertenecientes a una de las especies del grupo Oswaldoi y los clasificados como *A. oswaldoi* s.l., mostraron patrones de bandas correspondientes

al control de *A. nuneztovari* s.l. Los 16 mosquitos identificados como *A. darlingi* se confirmaron molecularmente como pertenecientes a dicha especie (tabla 1). Según estos resultados, el 99,23% de los especímenes analizados por PCR-RFLP-ITS2, fueron *A. nuneztovari* s.l. y el 0,77% *A. darlingi*. Ambos presentaron el patrón de bandas previamente reportado,^{21,22} para *A. nuneztovari* s.l.: 358, 96 y 76 pb (figura 1), y para *A. darlingi*: 321, 158 y 78 pb (figura 2). Sin embargo, es importante aclarar que los patrones producto de la restricción se observaron en geles de agarosa al 2%, y como lo reportaron Zapata *et al.*,²¹ la separación y visualización de los fragmentos depende la concen-

tración de agarosa en el gel; concentraciones como la que se usó en este trabajo permiten buena separación de los fragmentos, pero aquellos de tamaño pequeño tienden a difundirse y en muchos casos no se observan. Esto es lo que sucede con el fragmento de 76 pb en el patrón de *A. nuneztovari* y el de 78 pb en *A. darlingi*, los cuales no se observan (figuras 1 y 2).

DISCUSIÓN

El presente estudio hace parte de un Macroproyecto ejecutado por integrantes del Grupo de Microbiología

Tabla 1. Identificación morfológica y confirmación molecular de *Anopheles*.

Identificación morfológica	Número de mosquitos identificados por morfología (%)	Número de especímenes analizados PCR-RFLP-ITS2 (%)	Confirmación molecular (%)
<i>A. nuneztovari</i> s.l.	2.017 (97,44)	460 (22,8)	
<i>A. nuneztovari</i> s.l./ <i>A. rangeli</i>	9 (0,43)	9 (100)	
<i>A. nuneztovari</i> s.l./ <i>A. oswaldoi</i> s.l.	25 (1,21)	25 (100)	<i>A. nuneztovari</i> s.l. (99,23)
<i>A. nuneztovari</i> s.l./ <i>rangeli/oswaldoi</i> s.l.	1 (0,05)	1 (100)	
<i>A. oswaldoi</i> s.l.	2 (0,10)	2 (100)	
<i>A. darlingi</i>	16 (0,77)	16(100)	<i>A. darlingi</i> (0,77)
Total	2.070 (100)	513 (100)	(100)

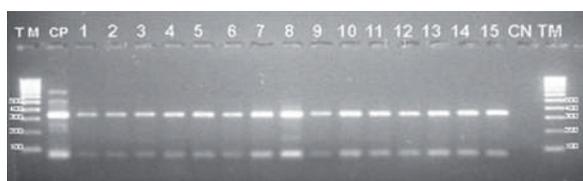


Figura 1. Confirmación molecular de especímenes *A. nuneztovari* s.l. por PCR-RFLP-ITS2. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: **TM:** tamaño molecular (100-10000 pb). **CP:** control positivo, clon de ITS2 de *A. nuneztovari* s.l. con respaldo de series. **CN:** Control negativo. **1-15:** especímenes *A. nuneztovari* s.l. de Juan José, Puerto Libertador, Córdoba.

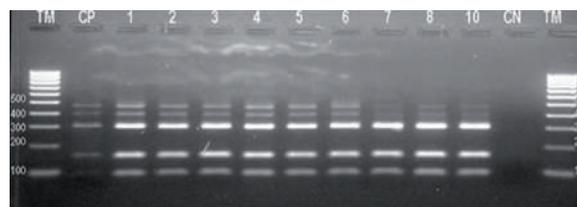


Figura 2. Confirmación molecular de especímenes *A. darlingi* por PCR-RFLP-ITS2. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: **TM:** tamaño molecular (100-10000 pb). **CP:** control positivo, clon de ITS2 de *A. darlingi* con respaldo de series. **CN:** Control negativo. **1-10:** especímenes *A. darlingi* de Juan José, Puerto Libertador, Córdoba.

Molecular, línea hospedero-parásito, y realiza un aporte a la elaboración del inventario de especies para la localidad de Juan José, municipio de Puerto Libertador, Córdoba. Ésta es una de las localidades donde se realizan muestreos en diferentes épocas del año para conocer las fluctuaciones en el número y composición de las especies anofelinas, las cuales pueden variar de acuerdo a aspectos como las condiciones ambientales y climáticas.³⁵ En este trabajo se realizó la confirmación molecular de la identificación morfológica de los especímenes recolectados en Juan José, entre el 31 de julio y el 5 de agosto de 2009. Con ello se contribuyó al inventario de especies en la localidad, la cual se ha caracterizado por presentar altos índices de malaria.

La confirmación molecular de los especímenes recolectados en Juan José, mostró que estos correspondían a dos de las especies consideradas como vectores primarios en Colombia, *A. nuneztovari* s.l. y *A. darlingi*. La especie predominante fue *A. nuneztovari* s.l. Estos resultados son similares a lo reportado por un estudio reciente realizado en varios municipios de Córdoba: Valencia, Tierralta, Puerto Libertador y Montelíbano,³⁶ los cuales, según la Gobernación de Córdoba, aportan el 97,5% de los casos de malaria del departamento.⁵ En dicho trabajo, se evaluó la localidad de La Bonga en Puerto Libertador, mientras nuestro trabajo fue realizado en Juan José. En ambos estudios, se encontró como especies predominantes a *A. nuneztovari* s.l. y *A. darlingi*. En el trabajo realizado por Gutiérrez *et al.*,³⁶ cuatro especímenes *A. nuneztovari* fueron encontrados infectados naturalmente (tres en el municipio de Montelíbano y uno en Tierralta); mientras que en La Bonga, un *A. darlingi* fue encontrado infectado, lo que sugiere la importancia que tienen estas dos especies en la transmisión de la malaria en Córdoba³⁶ y se podría presumir que tendrían un papel similar en Juan José. Los resultados del presente trabajo constituyen el primer reporte reciente de las especies halladas en dicha localidad, y aportan al panorama global de la composición de las especies del departamento de Córdoba. Trabajos futuros, dirigidos a la determinación de infectividad en los especímenes indicarán el papel de estas dos especies en la localidad.

No es sorprendente que los especímenes de Juan José identificados por morfología como pertenecientes a especies del grupo Oswaldoi, por la prueba molecular se confirmaran como *A. nuneztovari* s.l. Varios

trabajos han evidenciado el problema existente en la identificación de especies de este grupo, utilizado metodologías moleculares^{14, 21, 22} y no moleculares.^{11, 17, 37} La dificultad reside principalmente en el solapamiento de las relaciones morfométricas definidas durante la identificación de los especímenes, ya que varios de los rangos diagnósticos establecidos para estas especies en algunas manchas de la vena costal del ala y en la pata posterior, varían, y no concuerdan con lo reportado en las claves morfológicas disponibles.^{14, 37}

A. nuneztovari s.l., se caracteriza por presentar una alta variabilidad intraespecífica,³⁷ se ha sospechado que pudiera ser un complejo de especies,³⁸ y mediante el análisis del gen *White*, se detectaron cinco linajes entre poblaciones de Sur América, de los cuales dos se encuentran en Colombia.³⁹ En un estudio realizado en Colombia, se sugiere la presencia de una sola especie genética de *A. nuneztovari* s.l.; sin embargo, este estudio sólo incluyó cuatro poblaciones, una en el departamento de Chocó y una en el Valle, ubicadas al oeste de los Andes, y dos en el departamento de Norte de Santander, al este del país.⁴⁰ En el presente estudio, al igual que en otros trabajos, se demuestra la alta variabilidad morfológica de *A. nuneztovari* s.l., lo que dificulta la determinación de especie, y origina la confusión con otras especies del grupo Oswaldoi, principalmente *A. rangeli* y *A. oswaldoi* s.l.^{13, 14} El análisis de la genitalia de machos, provenientes de isofamilias de *A. nuneztovari* s.l. de tres poblaciones de Colombia, entre estas Tierralta, Córdoba, determinó que el 5% de los especímenes habían sido mal identificados y confundidos con otras especies del subgénero *Nyssorhynchus*: *A. oswaldoi* s.l. y *A. rangeli*.³⁷ Este mismo problema, fue evidenciado al realizar el análisis de tres relaciones morfométricas y la confirmación molecular por PCR-RFLP-ITS2 de especímenes *A. nuneztovari* s.l., recolectados en la localidad de Puerto Anchica, Montelíbano, Córdoba.¹⁴ Aunque en este trabajo no se detectaron especímenes correspondientes a las especies *A. rangeli* y *A. oswaldoi* s.l., estudios recientes en Puerto Libertador, Córdoba, reportaron *A. oswaldoi* s.l., que aunque en baja proporción, se confirmaron molecularmente.³⁶ Tanto *A. oswaldoi* s.l., como *A. rangeli*, se han considerado vectores de importancia local en el departamento de Putumayo, al sur de Colombia,¹⁰ por lo que no se descarta la posibilidad de que ellos puedan ser también vectores locales en Córdoba. Adicionalmente, en Colombia, se hayan presentes es-

pecies de *Anopheles* que en otros países se han reconocido como vectores de malaria, pero que en el nuestro no se conoce su papel en la transmisión.^{9, 22} Este es el caso de *A. benarrochi* que se considera vector en Perú,⁴¹ y que tiene características morfológicas similares a las descritas por Ruiz *et al.*,²⁷ para la variante *A. benarrochi* B, la cual es altamente antropofílica en el Putumayo, sur de Colombia, los autores sugieren que probablemente la variante *A. benarrochi* B esté presente en Perú y Colombia.^{23, 27} *A. triannulatus* s.l. se ha encontrado infectado en el Amazonas brasileiro⁴² y *A. aquasalis* es un vector en la isla de San Luis, ubicada al nordeste de Brasil.⁴³ Estas especies no fueron encontradas en el presente trabajo, pero si se han reportado en esta importante región endémica para malaria,^{31, 36} por ello, se recomienda dar continuidad a este tipo de estudios, y que además del inventario de especies, se realice la incriminación vectorial.

Entre los mosquitos recolectados en Juan José, también se encontró *A. darlingi*, para el cual se ha descrito un proceso de especiación incipiente.^{44, 45} Se pudo determinar, según análisis con el marcador *White*, que entre los especímenes de Centroamérica, incluido el noroeste de Colombia y los de la base del Amazonas existe diferenciación genética significativa, por lo que se sugiere la existencia de dos genotipos.^{45, 46} Sin embargo, el análisis del genoma del ADN mitocondrial de poblaciones de *A. darlingi* pertenecientes a Suramérica y Centroamérica, no proveen suficiente resolución para establecer diferentes unidades de especiación.⁴⁷ Específicamente en Colombia, un estudio que evaluó la variación genética de *A. darlingi* a una escala microgeográfica e incluyó población de *A. darlingi* de Antioquia y Córdoba, entre éstas, una de Puerto Libertador, demostró que el linaje del norte propuesto por Mirabello & Conn,⁴⁶ fue el encontrado en Córdoba y Antioquia; el análisis de *COI* también mostró que éstas poblaciones de *A. darlingi* son más cercanas genéticamente a las de América Central que a las de Sur América y que existe un alto flujo genético entre éstas poblaciones, por lo que los autores sugirieron que se podrían usar estrategias de control integradas para ambos departamentos.⁴⁸ En el presente estudio, sólo se realiza la confirmación molecular de los especímenes de Juan José, Puerto Libertador, Córdoba, y se observa que los resultados concuerdan con los obtenidos en la identificación morfológica,

sin evidencia que indique que se está presentando variación en esta especie.

Los resultados del presente trabajo contribuyen al inventario de especies en Juan José, localidad caracterizada por presentar altos índices de malaria. Estos datos son esenciales para la realización de estudios complementarios, como es la incriminación de vectores, para lo cual es importante, no sólo la realización del mapeo de especies presentes,^{6, 35} sino también la evaluación de aspectos como el comportamiento de los vectores, sus preferencias de picadura e infectividad natural por el parásito, entre otros.⁴⁹

Adicionalmente, este trabajo evidencia, una vez más, la importancia de utilizar herramientas como la PCR-RFLP-ITS2 para la confirmación de la identificación morfológica de especies anofelinas de difícil discriminación por caracteres morfológicos. Esta metodología es cada vez más utilizada en los estudios entomológicos, no sólo en nuestro país, sino también para la discriminación de anofelinos y vectores de malaria en otros países y regiones del mundo.^{26, 50-52} Todos estos trabajos tienen como premisa que la correcta identificación de los especímenes es esencial para mejorar el conocimiento de las especies responsables de la transmisión en zonas endémicas, información de importancia para direccionar las medidas de control.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados de este trabajo, las especies de *Anopheles* encontradas en el corregimiento de Juan José, Puerto Libertador, Córdoba, durante la época de muestreo se consideran vectores primarios en Colombia. Los resultados también evidenciaron la problemática ampliamente descrita en la literatura sobre la dificultad en la identificación de las hembras de *A. nuneztovari* s.l., y la importancia de utilizar pruebas moleculares para la confirmación de la identificación de especímenes del grupo Oswaldoi. La correcta identificación de las especies del género *Anopheles*, es esencial en el desarrollo de estudios complementarios, como el inventario de especies y la determinación de vectores en regiones endémicas. Ello permitirá no sólo identificar las áreas de mayor riesgo de transmisión de malaria, sino también contribuir al diseño de estrategias efectivas de control vectorial en dichas áreas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los miembros del Grupo de Microbiología Molecular de la Escuela de la Microbiología de la Universidad de Antioquia, por su cooperación en la realización de este proyecto.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Trabajo anidado a proyectos: RO3-AI076710, financiado por The National Institutes of Health-NIH, EUA, a MMC y 8700-074, del Comité para el Desarrollo de la Investigación -CODI-UdeA, a MMC, y contribuyó a la formación de dos estudiantes de pregrado.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses en esta publicación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **World Health Organization.** Malaria, Fact sheet N°94, 2009. [Actualizado en enero de 2009 y revisado en abril de 2009] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>.
2. **Global Malaria Programme, World Health Organization.** World Malaria Report. Geneva (Suiza), World Health Organization; 2008. 82 p.
3. **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.
4. **Instituto Nacional de Salud.** Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA. 2010. Semana Epidemiológica 52.
5. **Gobernación de Córdoba.** Situación Epidemiológica del Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores. Secretaría de Desarrollo de la Salud. Montería, Córdoba, Colombia. 2008; 19 p.
6. **González R.** Globalizar la información de Colombia sobre *Anopheles*: necesidad de actualizar la información. *Biomédica* 2009; 29(Supl.): 135-7.
7. **Olano V, Brochero H, Saenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica* 2001; 21: 402-8.
8. **Gutiérrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Trop.* 2008; 107(2): 99-105.
9. **Quiñones ML, Herrera M, Orjuela LI.** Incriminación de vectores de malaria e implicaciones para su control. *Biomédica.* 2009; 29(Supl.): 116-8.
10. **Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton YM.** Incrimination of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(6): 617-23.
11. **Calle LD, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo ON.** Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(8): 1191-5.
12. **Fernández R, Schoeler GB, Stancil J.** Presencia de *Anopheles benarrochi* en áreas de selva con transmisión malárica. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2004; 21: 217-22.
13. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. 2ª ed. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2009. 260p.
14. **Gómez GF, Cienfuegos AV, Gutiérrez LM, Conn JE, Correa MM.** Análisis morfológico y molecular evidencia problemas al identificar *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) por claves dicotómicas. *Rev Colombiana de Entomol.* 2010; 36(1): 68-75.
15. **Estrada DA, Quiñones ML, Sierra DM, Calle DA, Ruiz F, Erazo HF, Linton YM.** [Egg morphology as an indirect method to identify *Anopheles benarrochi*, *Anopheles oswaldoi* and *Anopheles rangeli* (Diptera: Culicidae)]. *Biomédica.* 2003; 23(4): 388-95.
16. **Motoki MT, Dos Santos CL S, Sallum MA.** Intraespecific Variation on the Aedeagus of *Anopheles oswaldoi* (Peryassú) (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol.* 2009; 38(1): 144-8.
17. **Calle DA, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo N.** Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biomédica.* 2008; 28(3): 371-85.
18. **Li C, Wilkerson R.** Identification of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(5): 495-500.
19. **Walton C, Somboon P, O'Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, Linton YM, Chen B, Nolan K, Duong S, Fong MY, Vythilingum L, Mohammed ZD, Ho Dinh Trung, Butlin RK.** Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles*

- maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. Infect Genet Evol. 2007; 7(1): 93-102.
20. **Brochero HH, Li C, Wilkerson RC.** A newly recognized species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreno, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76(6): 1.113-7.
 21. **Zapata MA, Cienfuegos AV, Quiros OI, Quinones ML, Luckhart S, Correa MM.** Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. Am J Trop Med Hyg. 2007; 77(1): 67-72.
 22. **Cienfuegos AV, Gómez GF, Córdoba LA, Luckhart S, Conn J, Correa MM.** 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 (Méx.). 2008; 19(1): 35-44.
 23. **Matson R, Tong Rios C, Banda Chavez C, Gilman RH, Florin D, Lopez Sifuentes V, Cardenas Greffa R, Fernandez R, Yori P, Velasquez portocarrero D, Vinetz J, Kosec M.** Improved molecular technique for the differentiation of neotropical anopheline species. Am J Trop Med Hyg. 2008; 78(3): 492-98.
 24. **Coleman AW.** ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends Genet. 2003; 19(7): 370-5.
 25. **Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Lourenco-de-Oliveira R, Flores-Mendoza C, Marinotti O.** Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. Med Vet Entomol. 2005; 19(2): 208-18.
 26. **Garros C, Koekemoer LL, Kamau L, Awolola TS, Van Bortel W, Coetzee M, Coosemans M, Manguin S.** Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70(3): 260-5.
 27. **Ruiz F, Quinones 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(2): 155-60.
 28. **Cienfuegos AV, Rosero DA, Naranjo N, Luckhart, Conn JE, Correa MM.** Evaluation of a PCR-RFLP-ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. Acta Trop. 2011. doi10.1016/j.actatropica.2011.02.004.
 29. **Faran M, Linthicum L.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Sys. 1981; 13: 1-81.
 30. **Wilkerson R, Strickman D.** Clave Ilustrada para la Identificación de las Hembras de Mosquitos de México y Centroamérica. Secretaria de Salud, Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, México; 1993. 46 p.
 31. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2007. 226 p.
 32. **Fuentelsaz C.** Cálculo del tamaño de la muestra. Matronas Profesión. 2004; 5(18): 5-13.
 33. **Rosero DA, Gutiérrez LA, Cienfuegos AV, Jaramillo LM, Correa MM.** Optimización de un procedimiento de extracción de ADN a partir de *Anopheles* spp. Rev Colombiana de Entomol. 2010; 36(2): 260-3.
 34. **Beebe NW, Saul A.** Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53(5): 478-81.
 35. **Pérez G, Pérez B, Mendoza DL, Blanco P.** Identificación de especies de *Anopheles* de importancia médica en el departamento de Sucre, Colombia. Duazary 2006; 3(2): 104-9.
 36. **Gutierrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(8): 1.117-24.
 37. **Fajardo M, González R, Suárez MF, López D, Wilkerson R, Mureb MA.** Morphological analysis of three populations of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae) from Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(1): 85-92.
 38. **Conn J, Puertas YR, Seawright JA.** A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 1993; 9(3): 294-301.
 39. **Mirabello L, Conn JE.** Population analysis using the nuclear *white* gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. Med Vet Entomol. 2008; 22(2): 109-19.
 40. **Sierra DM, Velez ID, Linton YM.** Malaria Vector *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Comprises One Genetic Species in Colombia Based on Homogeneity of Nuclear ITS2 rDNA. J Med Entomol. 2004; 41(3): 302-7.
 41. **Aramburú J, Ramal C, Witzig R.** Malaria Reemergence in the Peruvian Amazon Region. Emerg Infect Dis. 1999; 5: 209-15.
 42. **Da Rocha JA, De Oliveira SB, Póvoa MM, Moreira LA, Krettli AU.** Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 78: 872-77.
 43. **Da Silva AR, Tauil PL, Bastos JL, Batista W, Pereira EM, Do Rosário E.** Aspects of the focal transmission of malaria in the Island of São Luis, Maranhão. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(3): 250-4.

44. **Mirabello L, Conn JE.** Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity*. 2006; 96: 311-21.
45. **Mirabello L, Vineis JH, Yanoviak SP, Scarpassa VM, Póvoa MM, Padilla N, Achee NL, Conn JE.** Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *BMC Ecol*. 2008; 8: 3.
46. **Conn JE, Mirabello L.** The biogeography and population genetics of neotropical vector species. 2007. *Heredity*; 99: 245-6
47. **Moreno M, Marinotti O, Krzywinski J, Tadei WP, James AA, Achee NL, Conn JE.** Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to anopheline divergence time. *Malar J* 2010; 9:127.
48. **Gutiérrez LA, Gómez GF, González JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Microgeographic Genetic Variation of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(1): 38-47.
49. **Brochero H, Quinones ML.** Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. *Biomédica*. 2008; 28(1): 18-24.
50. **Beebe NW, Cooper RD, Foley DH, Ellis JT.** Populations of the south-west Pacific malaria vector *Anopheles farauti* s.s. revealed by ribosomal DNA transcribed spacer polymorphisms. *Heredity*. 2000; 84 (2): 244-53.
51. **Goswami G, Raghavendra K, Nandab N, Gakhar SK, Subbarao SK.** PCR-RFLP of mitochondrial cytochrome oxidase subunit II and ITS2 of ribosomal DNA: Markers for the identification of members of the *Anopheles culicifacies* complex (Diptera: Culicidae). *Acta Trop*. 2005; 95: 92-9.
52. **Van Bortel W, Sochantana T, Harbach RE, Socheat D, Roelants P, Backeljau T, Coosemans M.** Presence of *Anopheles culicifacies* B in Cambodia established by the PCR-RFLP assay developed for the identification of *Anopheles minimus* species A and C and four related species. *Med Vet Entomol*. 2002; 16(3): 329-34.