Determinación del papel como vector de malaria de las especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Meta, Colombia

MARTHA LILIANA AHUMADA FRANCO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Infecciones y Salud en el Trópico

Bogotá, D. C. 2009

Determinación del papel como vector de malaria de las especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Meta, Colombia

Martha Liliana Ahumada Franco

Trabajo de grado
Presentado como requisito parcial para optar al título de
Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico

Martha Lucía Quiñones P. MSc. PhD
Directora

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Programa de maestría en Infecciones y Salud en el Trópico

Bogotá, D. C. 2009

Agradecimientos

Deseo expresar sincero agradecimientos:

- Al Instituto Nacional de Salud por el apoyo para realizar los estudios de maestría y por la cofinanciación de este proyecto.
- A Colciencias por la financiación del proyecto.
- A la Secretaría de Salud del Meta por el apoyo en la realización de las actividades de campo.
- Al Dr. Luís Alberto Gómez, Yibby Forero y Álvaro Calvache, Subdirectores de Investigación, Instituto Nacional de Salud.
- A la Dra. Martha Lucía Quiñones por la oportunidad de aprender de vectores de malaria y la dirección de este trabajo.
- A la Dra. Luz Stella Buitrago y a su equipo del grupo de Entomología por el apoyo incondicional en el desarrollo de las actividades de campo.
- Al Dr. Jaime Ramírez Ávila por su amistad y el apoyo en el desarrollo de este proyecto.
- A Paula Ximena Pareja por el apoyo en la realización del trabajo de campo y laboratorio.
- A Marco Fidel Suárez por su valioso apoyo en el trabajo de campo y laboratorio.
- A Manuela Herrera y Lorena Orjuela por su amistad y apoyo incondicional para la ejecución del proyecto.
- A la Dra. Jan E. Conn por su apoyo para la obtención de las secuencias de los marcadores moleculares.
- A la Dra. Maria Anice Sallum por la confirmación taxonómica de *Anopheles costai.*
- A Olga Lucía Cabrera y Erika Santamaría por su apoyo incondicional para la ejecución de este proyecto.
- Y a las personas que con su apoyo y amistad hicieron posible realizar este trabajo.

Tabla de contenido

1 Introducción 7
1.1 Mosquitos vectores de malaria 10
1.1.1 Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Meta ... 11
1.1.2 Antecedentes de infección por *Plasmodium* en especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Meta 13
1.1.3 Vectores de malaria en el departamento del Meta 14
2 Hipótesis 17
3 Objetivos 17
3.1 Objetivo general 17
3.2 Objetivos específicos 17
4 Materiales y métodos 18
4.1 Área de estudio 18
4.2 Recolección de material entomológico 20
4.2.1 Recolección de inmaduros y descripción de sitios de cría 20
4.2.2 Caracterización del comportamiento de picadura de las especies de *Anopheles* 20
4.2.3 Detección de variación estacional en el comportamiento de las especies de *Anopheles* 21
4.3 Identificación del material entomológico 21
4.3.1 Obtención de series entomológicas. 21
4.3.2 Determinación taxonómica 22
4.3.3 Confirmación molecular de las especies 22
4.4 Detección de infección natural por Plasmodium spp. 24
4.5 Análisis de datos 24
5 Resultados 25
5.1 Determinación taxonómica de las especies de Anopheles 25
5.2 Confirmación taxonómica de las especies 26
5.3 Identificación de los sitios de cría para las especies de Anopheles ... 29
5.4 Caracterización del comportamiento de picadura de las especies de Anopheles 31
5.4.1 Detección de variación estacional en el comportamiento de las especies de *Anopheles* 32
5.5 Infección natural y tasa de inoculación entomológica (TIE) 40
6 Discusión de resultados 42
7 Conclusiones 55
8 Recomendaciones 57
9 Referencias bibliográficas 58

Resumen

En Colombia el 85% del territorio por debajo de los 1.600 m.s.n.m presenta transmisión de malaria. El departamento del Meta presenta una transmisión variable, endémica o epidémica donde la mayoría de los casos son originados por infección con *Plasmudium vivax* y *P. falciparum.* Los estudios de comportamiento, epidemiológicos y los hallazgos de infección natural han incriminado a *Anopheles darlingi* como el principal vector. Sin embargo, en este departamento se han identificado 24 especies más de *Anopheles* entre las que están incluidas especies que hacen parte de complejos, tal es el caso de *An. marajoara* (complejo *Albitarsis*), *An. oswaldoi* (complejo *Oswaldoi*), *An. triannulatus* (complejo de *Triannulatus*) y *An. pseudopunctipennis,* y otras especies reconocidas como vectores de malaria en otras regiones de América. Por esta razón es necesario actualizar las especies de *Anopheles* reportadas para este departamento y establecer el papel que cada una de ellas juega el mantenimiento de la transmisión de la malaria. A partir de 5.215 mosquitos recolectados en sitios de cría y con atrayente humano protegido se identificaron 12 de las 25 especies registradas para el departamento: *An. argyritarsis*, *An. braziliensis*, *An. costai, An. darlingi, An. neomaculipalpus*, *An. nimbus*, *An. peryassui*, *An. pseudopunctipennis* s.l. y *An. rangeli*. De los complejos de especies se confirmó la presencia de *An. marajoara, An. triannulatus* s.s. y *An. oswaldoi* B. En criaderos *An. darlingi* (31%) fue la especie más abundante seguida de *An. marajoara* (23%) y *An. rangeli* (16%). De 3.667 mosquitos recolectados con atrayente humano protegido se encontró que *An. darlingi* fue la especie más abundante con un 95% del total de especímenes capturados, seguida de *An. marajoara* (2,4%), *An. braziliensis* (0,7%), *An. oswaldoi* B (0.7%) y *An. rangeli* (0,5%), las cuales a excepción de *An. braziliensis,* tienen antecedentes como vectores de malaria. Aunque se confirmó la presencia de otras especies de *Anopheles* en el departamento del Meta, con antecedentes de infección o vectores reconocidos en otros países de América, solo se

encontró positivo para infección con *P. falciparum* a *An. darlingi*. Esto, junto con su una amplia distribución y características en su comportamiento que favorecen la transmisión del parásito al humano, permiten confirmar su papel en la transmisión de malaria en el departamento. Sin embargo, los estudios de comportamiento de picadura y actividad estacional permitieron establecer que las otras especies de *Anopheles* que son susceptibles de infectarse con parásitos de *Plasmodium* incluyen al hombre como fuente de alimento sanguíneo, acceden al domicilio humano y están activas durante el tiempo en que la población está más expuesta a las picaduras, características que les permitirían actuar como vectores primarios o secundarios cuando las condiciones ambientales favorezcan su proliferación y haya un aumento de la tasa de infección con el parásito. Teniendo en cuenta los resultados se recomienda a las autoridades de salud y a la población del departamento del Meta ampliar el uso de mosquiteros tratados pero complementado con medidas de protección personal y educación que contribuyan a la reducción del contacto hombre-vector en las horas en que la población está más expuesta a las picaduras de los mosquitos.

1

Introducción

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium* transmitidos al hombre por mosquitos del género *Anopheles*. A nivel mundial esta patología continúa siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en países tropicales y subtropicales del mundo, particularmente en África. En el 2008 se identificaron 109 países con malaria endémica (Figura 1). Se estima que anualmente se presentan entre 350 y 500 millones de episodios al año, causados principalmente por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, y un millón de muertes en menores de cinco años entre 3.300 millones de personas en riesgo (WHO, 2008).

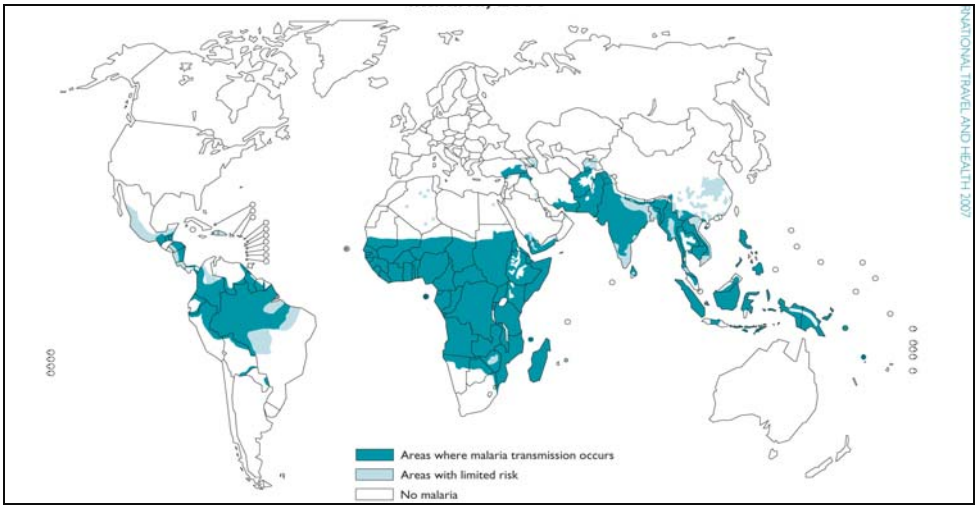
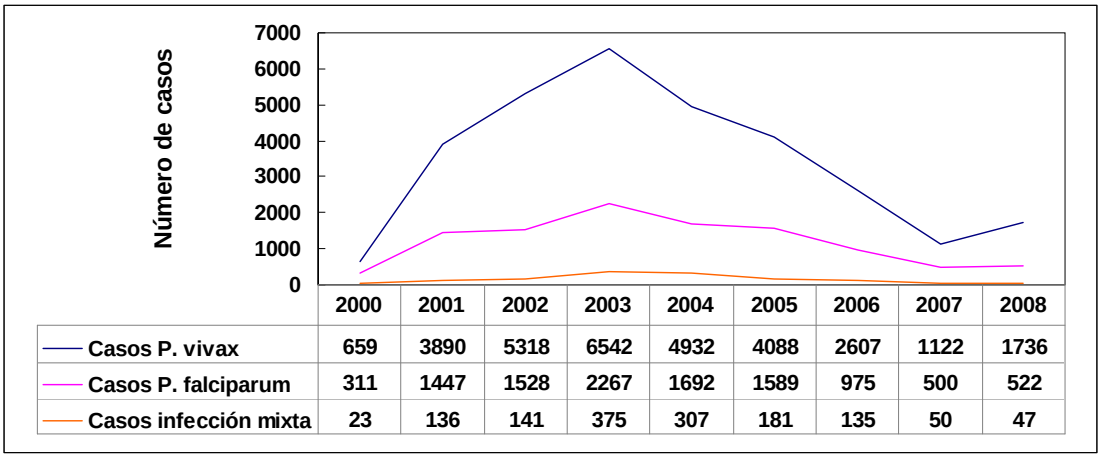


Figura 1. Mapa de riesgo de transmisión de malaria, 2006. (WHO, 2008)

En Latinoamérica, Colombia ocupa el segundo lugar en el reporte de casos anuales después de Brasil, en donde la transmisión ocurre en el 85% del territorio situado por debajo de los 1.600 m.s.n.m. y se estima que aproximadamente el 60% de la población se encuentra en riesgo de enfermar o morir por esta enfermedad. Se han identificado seis regiones con mayor transmisión, la región de la Amazonía, Atlántica, Centro Oriente, Urabá-Bajo Cauca- Alto Sinú, Orinoquía y Pacífica (Padilla y Peña, 2002). La Orinoquía,

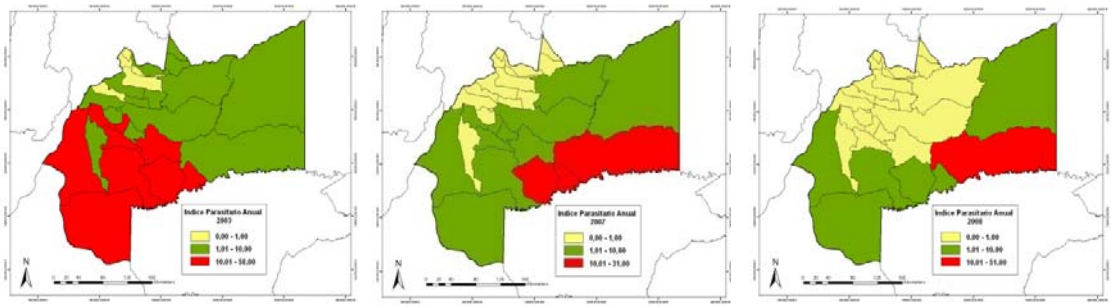
ocupa el tercer lugar en número de casos, siendo el departamento del Meta el que ocupa el segundo lugar con índices Parasitarios anuales (IPA, número de casos por 1.000 habitantes) superiores a 17 (Padilla y Peña, 2002; Zambrano, 2006). En este departamento se destaca el predominio de infecciones por *P. vivax* (72%), seguido de *P. falciparum* (25%). En el comportamiento de la malaria entre 2000-2008 se observó un aumento de los casos en el 2003 con un posterior descenso de la incidencia entre el 2004 y el 2008 (Sivigila, Instituto Nacional de Salud, 2009) (Figura 2).



	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Casos P. vivax	659	3890	5318	6542	4932	4088	2607	1122	1736
Casos P. falciparum	311	1447	1528	2267	1692	1589	975	500	522
Casos infección mixta	23	136	141	375	307	181	135	50	47

Figura 2. Comportamiento de la malaria en el departamento del Meta entre 2000 y 2008 (SIVIGILA, 2009).

Al realizar el mapa de riesgo con los IPA correspondiente al año de mayor incidencia, 2003, comparado con el periodo 2007-2008, se establece que para el 2003, 24 de los 29 municipios del departamento corresponden a regiones del mediano y alto riesgo y para los años 2007 y 2008 habían disminuido a 14 y 11 respectivamente siendo únicamente los municipios de Puerto Rico, Mapiripán y Puerto Concordia las áreas de alto riesgo de transmisión para este periodo de tiempo (Figura 3).



a. 2003 b. 2007 c. 2008

Figura 3. Comparación en la distribución de la incidencia de la malaria en el departamento del Meta.

Durante el año 2008 se presentó un aumento de los casos de malaria en el municipio de Villavicencio, donde se detectaron 69 casos de *P. vivax* y 36 de *P. falciparum*. La construcción del canal endémico a partir de los registros de SIVIGILA de 2003 a 2008 permitió establecer que históricamente se presenta un aumento de los casos durante la semana 8 que corresponden con el mes de febrero. El resto del año la transmisión es estable con un aumento en el número de casos entre abril y julio (Figura 4).

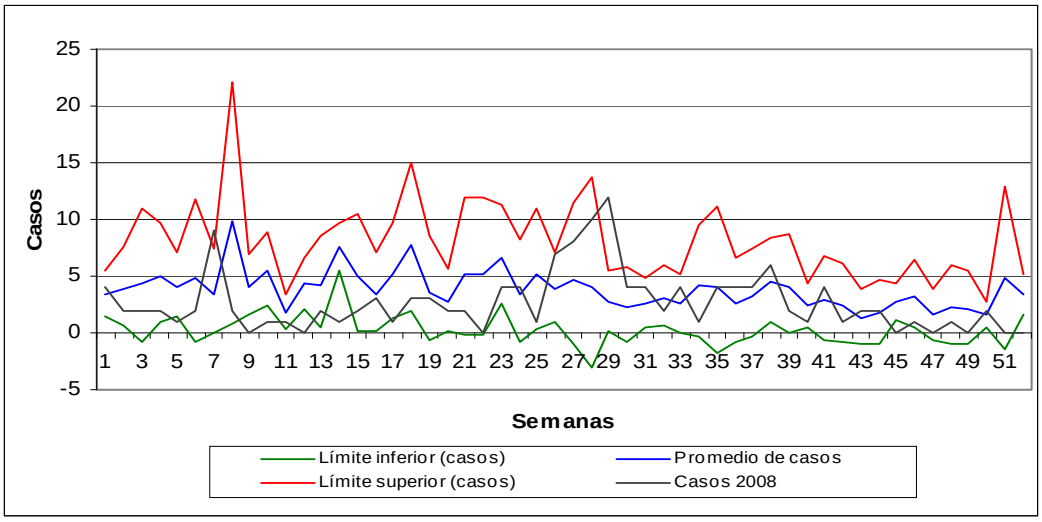


Figura 4. Canal endémico para malaria del municipio de Villavicencio 2003-2008 (Fuente: SIVIGILA, 2009).

1.1 Mosquitos vectores de malaria

Aunque en el mundo se han registrado más de 3.500 especies de mosquitos pertenecientes a 42 géneros, se ha establecido que únicamente las especies del género *Anopheles* son capaces de transmitir los parásitos causantes de malaria en humanos. Este género contiene más de 500 especies de las cuales 70 son capaces de transmitir el parásito, sin embargo solo 40 de ellas han llegado a tener un papel importante en la transmisión de malaria en el mundo (Service y Townson, 2002; Marrelli *et al*., 2006).

En Colombia se registran aproximadamente 45 especies de *Anopheles*, siendo sólo 9 de ellas consideradas vectores de malaria, las cuales han sido incriminadas como vectores de *Plasmodium* basados en correlación entre la distribución geográfica y la presencia de transmisión de malaria, en registros de disección de glándulas salivares, detección de la infección con parásitos *Plasmodia* humano mediante las técnicas inmunoradiométrica (IRMA) y ELISA (SEM, 1957; Herrera *et al,* 1987; Quiñones *et al*., 2006). Como vectores primarios se consideran *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926*, An.* (*Nys*.) *albimanus* Wiedemann, 1820 y *An.* (*Nys.*) *nuneztovari* Gabaldon 1940, y como vectores secundarios: *An.* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar and Knab 1912*, An.* (*Kerteszia*) *lepidotus* Zavortink 1973 *An.* (*Anopheles*) *pseudopunctipennis* Theobald 1901 y *An.* (*Anopheles*) *punctimacula* Dyar y Knab 1906 (SEM, 1957; Quiñones *et al*, 1987; Herrera *et al,* 1987; Olano *et al*., 2001). Sin embargo, recientemente se han incriminado en el departamento del Putumayo a *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *rangeli* Gabaldón, Cova-García y López, 1940 y *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi* (Peryassu 1922) (Quiñones *et al.,* 2006).

1.1.1 Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Meta

Para el departamento del Meta se han registrado 25 especies de *Anopheles*: *An*. *apicimacula* Dyar y Knab, 1906; *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy, 1827; *An. bambusicolus* Komp, 1937; *An. boliviensis* (Theobald, 1905); *An*. *braziliensis* (Chagas, 1907); *An. darling* Root, 1926; *An. eiseni* Coquillett, 1902; A*n. forattinii* Wilkerson y Sallum 1999; *An. gilesi* (Peryassu, 1908); *An. homunculus* Komp, 1937; *An. lepidotus* Zavortink, 1973; *An. marajoara* Galvao y Damasceno 1942; *An. mattogrossensis* Lutz y Neiva, 1911; *An. neomaculipalpus* Curry, 1931; *An. nimbus* (Theobald, 1902); *An. oswaldoi* (Peryassu, 1922b); *An. parvus* (Chagas, 1907); *An. pseudopunctipennis* Theobald, 1901; *An. peryassui* Dyar y Knab, 1908; *An. punctimacula* Dyar y Knab 1906; *An. rangeli* Gabaldón, Cova-García y López, 1940; *An. squamifemur* Antunes 1937; *An. strodei* Root, 1926; *An. triannulatus* Neiva y Pinto*,* y *An. trinkae* Faran, 1979 (Renjifo, 1948; Bates y Zulueta, 1949; Renjifo y Zulueta, 1974; SEM, 1957; Faran, 1980; Sallum *et al*., 1999; Wilkerson y Sallum *et al*., 1999; Olano *et al*., 2001; Brochero *et al*., 2005; González y Carrejo, 2007).

Algunas de las especies antes mencionadas se reconocen como miembros de complejos o especies crípticas tal es el caso de *An. marajoara* (Wilkerson *et al*., 1995a,b), *An. oswaldoi* (Marrelli *et al*., 1999), *An. triannulatus* (Silva-do-Nascimento *et al*., 2006), *An. pseudopunctipennis* (Estrada-Franco *et al*., 1993a, 1993b) y *An. mediopunctatus* (Lutz 1903) (Sallum *et al*., 1999).

An. marajoara, pertenece al complejo *Albitarsis* en el cual se encuentran también *An. albitarsis* s.s., *An. oryzalimnetes* Wilkerson y Motoki, 2009, *An. deaneorum* Rosa-Freitas (Wilkerson *et al*., 1995a, 1995b; Wilkerson *et al*., 2005, Li y Wilkerson, 2005; Motoki *et al.,* 2009), *An. janconnae* Wilkerson y Sallum 2009 (Lehr *et al*., 2005; Motoki *et al.,* 2009) y recientemente se describió para Colombia en el departamento de Vichada, municipio de Puerto Carreño la

especie *An. albitarsis* F (Brochero *et al*., 2007). Las hembras adultas del complejo solo pueden ser diferenciadas por técnicas de biología molecular, o por la asociación de caracteres morfológicos de sus diferentes estadios, aunque esto último solo es válido para *An. deaneorum* (Wilkerson *et al*., 1993; 1995b). El reporte de *An. marajoara* en el departamento del Meta requiere de confirmación, dado que *An. albitarsis* F podría estar también presente en esta región.

Una situación similar ocurre con *An. oswaldoi*, donde el complejo está conformado por al menos 4 especies, de las cuales hasta el momento han sido registradas en Colombia *An. oswaldoi* A, B y C (Ruiz *et al*., 2005; Quiñones *et al*., 2006; Ruiz F, Wilkerson RC, Ponsoby D, Quiñones ML, Sallum MA, Linton YM. Molecular systematics of the *Oswaldoi* Complex (*Anopheles: Nyssorhynchus*) in South America. Memorias 75 Annual Meeting of the American Mosquito Control Association, Nueva Orleans, EU, abril de 2009), siendo *An. oswaldoi* s.s. hasta ahora encontrado únicamente en Brasil (Motoki *et al*., 2007; Sallum *et al*., 2008).

Del complejo de *Triannulatus* se conoce que comprende tres especies. *An. triannulatus* s.s., especie con una amplia distribución desde Nicaragua hasta Argentina (Faran y Linthicum, 1981; Chadee y Wilkerson, 2005) y *An. halophilus* Silva-do-Nascimento y Lourenço-de-Oliveira y *An. triannulatus* C que hasta ahora solo han sido encontradas en el centro de Brasil (Silva-do-Nascimento y Lourenço-de-Oliveira, 2002; Silva-do-Nascimento *et al*., 2006), sin embargo, existe la posibilidad de que las especies del complejo estén presentes en otros países de centro y suramérica.

Bajo el nombre de *An. pseudopunctipennis* hay evidencia, por experimentos con cruces, citogenética, análisis de isoenzimas y del ADN ribosomal que existen al menos dos especies diferentes en este complejo (Estrada-Franco *et al*., 1993a,1993b, 1993c; Coetzee *et al*., 1999). *An. pseudopunctipennis* A, presente en localidades de México y *An. pseudopunctipennis* B, presente en Bolivia y

Perú (Estrada-Franco *et al*., 1993c). Hasta el momento no se ha establecido a que especie del complejo pertenecen las poblaciones de Colombia.

An. mediopunctatus s.l. estaba incluida entre las especies registradas para el departamento del Meta (Gast, 1943; SEM, 1957; González y Carrejo, 2007). Sin embargo, estudios taxonómicos establecieron que bajo este nombre se incluían tres especies *An. mediopunctatus,* restringida al sureste de Brasil, *An. costai* y *An. forattinii*. Estos trabajos incluyeron en su revisión material entomológico del Meta lo que permitió confirmar la presencia de *An. costai* y *An. forattinii* en este departamento. Se ha establecido que estas dos especies presentan una distribución simpátrica (Sallum *et al*., 1999; Wilkerson y Sallum, 1999). En Colombia es necesario realizar trabajos que permitan confirmar la distribución de estas especies dado que fueron incluidas dentro de *An. mediopunctatus* (González y Carrejo, 2007).

1.1.2 Antecedentes de infección por *Plasmodium* en especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Meta

De las especies de *Anopheles* presentes en el Meta únicamente han sido encontradas infectadas en este departamento con *P. falciparum* a *An. marajoara* 0,7% (= *An. allopha o An. albitarsis*) y *An*. *darlingi* 0,06% (Renjifo, 1948; Herrera *et al,* 1987). Sin embargo, se registran otras especies que han sido halladas infectadas con parásitos del género *Plasmodium* o tienen importancia como vectores de malaria en otros países de América pero que hasta el momento se desconoce el papel que juegan en el mantenimiento de la transmisión de la malaria en este departamento (Tabla 1).

1.1.3 Vectores de malaria en el departamento del Meta

Los estudios de comportamiento y epidemiológicos unidos a los hallazgos de infección confirman a *An. darlingi* como el principal vector de malaria en este departamento (De Zulueta, 1950; Bates y Zulueta, 1949; Olano *et al.,* 2001). Una característica que hace de *An. darlingi*, el vector más eficiente de los parásitos de malaria en las Américas, es su comportamiento altamente antropofílico con actividad endofágica y exofágica (Acosta, 1969; Forattini,1987; Rubio-Palis, 1995; Rubio-Palis, 2000). Varios trabajos realizados en Latinoamérica acerca del comportamiento de esta especie, particularmente en lo que respecta con la actividad de picadura, han mostrado que presenta patrones de picadura variable dependiendo de la localidad y la estación climática en la que se hace la recolección de los insectos (Forattini, 1987; Rozendaal, 1989; Klein y Lima, 1990; Rubio-Palis, 1995; Voorham, 2002; León *et al.*, 2003; Tineo *et al.*, 2003; Brochero *et al.,* 2005; Moreno *et al.,* 2007; Girod *et al.,* 2008).

En Colombia se ha observado que *An. darlingi* presenta una mayor actividad de picadura entre las 18:00-19:00 h y las 22:00-24:00 h (Elliott, 1972; Brochero *et al.,* 2005). Sin embargo es necesario tener en cuenta que este patrón puede cambiar debido al comportamiento estacional que ha sido registrado para esta especie, es decir, altas densidades en los meses lluviosos y bajas en los meses más seco (Fernández *et al.*, 1995; Rubio-Palis, 1995; Voorham, 2002; Moreno *et al.,* 2007). En un estudio realizado en Villavicencio en la década de los 40 se observó que la habilidad de *An. darlingi* como vector disminuía después de finalizar la estación lluviosa (Renjifo, 1948; Renjifo y Zulueta, 1974).

Tabla 1. Especies de *Anopheles* del Meta con antecedentes de infección con *Plasmodium*.

Especie	Infección natural	Localidad
An. marajoara (=An. allopha, An. albitarsis)	ELISA	Amapá, Brasil (Povoa *et al*., 2001; Conn *et al.,* 2002). Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 1992)
	IRMA	Meta, Colombia (Herrera *et al*., 1987) Rondonia, Brasil (Oliveira-Ferreira *et al.,*1990)
An. oswaldoi s.l.	ELISA	Putumayo, Colombia (Quinoñes *et al.,* 2006) Venezuela (Rubio-Palis *et al*.,1992)
	IRMA	Rondônia, Brasil (Oliveira-Ferreira *et al.,*1990)
	Disección de glándulas salivares	Junín, Perú (Hayes *et al*., 1987)
An. rangeli	ELISA	Putumayo y Caquetá, Colombia (Quiñones *et al.,* 2006). Amapá, Brasil (Povoa *et al.,* 2001)
	Disección de glándulas salivares	Junín, Perú (Hayes *et al*., 1987)
An. trinkae	Disección de glándulas salivares	Perú (Hayes *et al*., 1987).
An. pseudopunctipennis s.l	Disección de glándulas salivares	Perú (Hayes *et al*., 1987).
An. braziliensis	ELISA	Amapá, Brasil (Povoa *et al.,*2001)
	IRMA	Rondônia, Brasil, (Oliveira-Ferreira *et al.,*1990)
An. costai (= An. mediopunctatus)	Disección de glándulas salivares	Valle y Nariño, Colombia (Ferrer, 1956)
An. triannulatus s.l.	IRMA	Rondonia, Brasil (Oliveira-Ferreira *et al.,*1990)
	Disección de glándulas salivares	Brasil (Arruda *et al*., 1986)
An. neomaculipalpus	ELISA	Bolívar, Venezuela (Moreno *et al*., 2005)
	IRMA	Meta, Colombia (Herrera *et al*., 1987)

En los últimos años se ha demostrado la importancia de realizar estudios regionales acerca de las poblaciones de *Anopheles*, los cuales permitirían la confirmación taxonómica de las especie de este género (Lounibos y Conn, 2000), dado que en las áreas de transmisión pueden estar registradas especies que hacen parte de complejos, los cuales incluyen vectores y no vectores de malaria que en ocasiones pueden estar en simpatría (Collins y Paskewitz, 1996; Kreutzer *et al*., 1976; Wilkerson *et al*., 1995a, 1995b; Rosa-Freitas *et al*., 1998; Marrelli *et al*., 2005). La confirmación taxonómica unida a la detección de infección natural con *Plasmodium* y a la caracterización de los hábitos de picadura contribuye al entendimiento de la dinámica de transmisión, conocimiento que es indispensable para la selección de las medidas de control vectorial adecuadas en cada área (Zimmerman, 1992; Grieco *et al.,* 2005).

El presente estudio se realizó con el propósito de determinar las especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Meta y conocer su infección natural con *Plasmodium*, comportamiento de picadura y preferencias de sitios de cría.

2 Hipótesis

Ho: Solo *An. darlingi* mantiene la transmisión de la malaria en el Meta.

Ha: *An. darlingi* y otras especies del género *Anopheles* mantienen la transmisión de malaria durante todo el año en el Meta

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar las especies del género *Anopheles* presentes en el departamento del Meta y su papel en la transmisión de la malaria.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar las especies del género *Anopheles* presentes en el departamento del Meta.
- Determinar la infección natural con *Plasmodium falciparum, P. vivax* VK210 y *P. vivax* VK270 de las especies identificadas.
- Caracterizar el comportamiento de picadura a humanos con relación a la transmisión y sitios de cría.
- Detectar los cambios estacionales en la densidad de las especies encontradas a través del año y comparar su comportamiento con el de otros vectores reconocidos.
- Calcular la tasa entomológica de inoculación (TEI) de las especies de *Anopheles* en las cuales se detecte infección con *P. falciparum* y *P. vivax.*

4 Materiales y métodos

4.1 Área de estudio

El departamento del Meta está localizado en la región de la Orinoquía entre los 4°54’25” y 1°36’52” de latitud norte y los 71°04’38” y 74°53’57” de longitud oeste. El territorio está conformado por una zona montañosa representada por el flanco oriental de la Cordillera Oriental, el piedemonte, zona de transición entre la cordillera y la llanura, la Serranía de La Macarena y la llanura que ocupa el centro y oriente del departamento. El clima, propio de zonas tropicales, se caracteriza por presentar niveles de precipitación que van desde 2.000 mm hasta 6.000mm o más al año con un periodo prolongado de lluvias que va desde marzo hasta noviembre. El periodo más seco se da entre diciembre y marzo debido al efecto de los vientos alisos sobre el territorio. La temperatura en el departamento oscila entre los 4°C en el páramo hasta valores por encima de 24°C en la llanura. En el piedemonte la temperatura varía entre 18°C y 24°C (IGAC, 1996). La diversidad de ecosistemas con condiciones ambientales adecuadas para la transmisión de malaria hacen que en este departamento haya áreas de transmisión variable, endémica o epidémica en las cuales se puede incrementar por el desplazamiento poblacional de susceptibles y portadores de parásitos (Padilla y Peña, 2002).

Para la recolección del material entomológico se seleccionaron municipios que históricamente han sido considerados de bajo riesgo de transmisión como Villavicencio, mediano riesgo como Fuente de Oro, Granada y San Martín y alto riesgo como Puerto Concordia/Puerto Rico y Vista Hermosa (Figuras 3 y 5). Se identificaron en cada municipio las localidades donde se habían presentado los casos de malaria y a las cuales se tenía acceso. En las localidades seleccionadas se ubicaron las viviendas donde se habían registrado

transmisión. En cada una de ellas se llevó a cabo la recolección de mosquitos, adultos e inmaduros, y la descripción de los sitios de cría (Tabla 2).

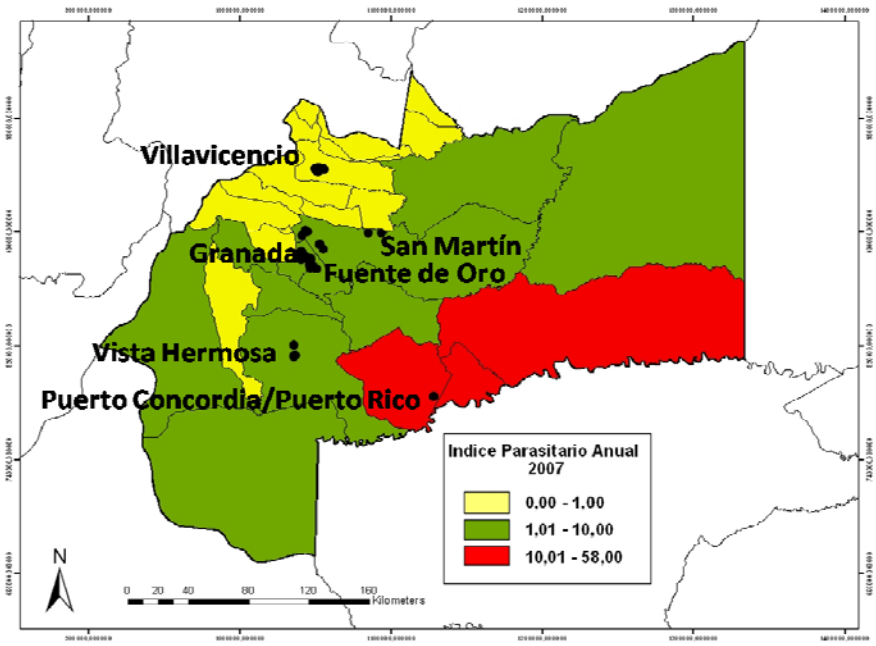


Figura 5. Ubicación de los sitios de muestreo en el mapa de IPA del año 2007.

Tabla 2. Localidades y fecha de de recolección del material entomológico.

Municipio	Localidad	Fecha	Coordenadas geográficas	
			LN	LW
Fuente de Oro	El Porvenir	Marzo-2008	3,46653	73,66070
Granada	La Florida	Junio-2007	3,56736	73,71966
Puerto Concordia	La Cascada	Septiembre-2007	2,65014	72,93171
San Martín	El Carmen	Octubre 2007	3,68808	73,24066
	La Libertad		3,68850	73,31576
	Chaparral		3,58566	73,58741
	San Francisco		3,61505	73,60947
	Iracá		3,67234	73,71066
	El Merey		3,69867	73,67476
Villavicencio	La Cecilia	Julio-2008 a junio-2009	4,09003	73,57994
	Apiay		4.10170	73,61520
	Barcelona		4,09143	73,58203
	Zuria		4,07910	73,61717
	La Rosita		4,11228	73,61333
	Santa Librada		4,09810	73,64075
	Villa Hermosa		4,09950	73,62836
Vista Hermosa	Los Alpes	Octubre-2008	2,90731	73,76205

4.2 Recolección de material entomológico

4.2.1 Recolección de inmaduros y descripción de sitios de cría

La búsqueda de los sitios de cría se realizó a una distancia hasta de 1.000 m de la vivienda seleccionada para la recolección de los mosquitos adultos. Adicionalmente, a estos se visitaron áreas de los alrededores con el fin de caracterizar la población de *Anopheles* presente en el municipio, en principio priorizando aquellas localidades con antecedentes de transmisión. Las larvas fueron recolectadas con cucharones y posteriormente empacadas en vasos plásticos y transportadas al laboratorio de la Secretaría de Salud del Meta y al Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud para la cría. Para cada uno de los sitios de cría revisados se estableció la distancia a la vivienda más cercana, tipo de criadero, es decir, caño, laguna, pantano (temporal y permanente), estanque piscícola y pozo y porcentaje de sombra sobre el área total del criadero (Ver anexo 1).

4.2.2 Caracterización del comportamiento de picadura de las especies de *Anopheles*

Para establecer los patrones de comportamiento de picadura de las especies de *Anopheles* con respecto al domicilio humano, se recolectaron mosquitos adultos con atrayente humano protegido simultáneamente en el intradomicilio y peridomicilio entre las 18:00 y las 6:00 h por 2 a 3 días, con rotación de los recolectores cada hora entre los dos sitios antes mencionados. Las capturas se realizaron durante los primeros 50 minutos de cada hora. Los mosquitos se colocaron en frascos rotulados especificando lugar (intradomicilio o peridomicilio), fecha, hora, recolector y número de mosquitos. Después de haberlos matado utilizando acetato de etilo o trietilamina se empacaron individualmente en viales Eppendorf® de 1.5 ml con la tapa perforada. Los tubos se empacaron en bolsas de cierre hermético que contenían silicagel para

la preservación del material entomológico. Las capturas se realizaron con personal entrenado de la Secretaría de Salud de Meta y del Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud. La Información de la captura fue consignada en el formato No. 1 Actividad de picadura (Anexo 2).

La selección de la vivienda se realizó teniendo en cuenta el número de mosquitos recolectados durante las primeras seis horas de la primera noche de captura. Después de seleccionar la vivienda con mayor densidad se procedió a realizar la actividad de picadura el resto de la noche y las dos noches siguientes.

4.2.3 Detección de variación estacional en el comportamiento de las especies de *Anopheles*

Para establecer los patrones de variación estacional de las especies de *Anopheles* se seleccionó una localidad del municipio de Villavicencio y se identificó una vivienda con antecedentes de transmisión de malaria en el 2008. Entre julio de 2008 y junio de 2009 los mosquitos se recolectaron con atrayente humano protegido simultáneamente en el intradomicilio y peridomicilio entre las 18:00 a las 6:00 h por 3 a 4 días cada mes, con rotación de los recolectores cada hora entre los dos sitios antes mencionados con el fin de evitar el sesgo de recolector. Posteriormente los mosquitos se empacaron como se describió anteriormente.

4.3 Identificación del material entomológico

4.3.1 Obtención de series entomológicas.

Las larvas de todos los estadios recolectadas en los sitios de cría se transportaron al laboratorio para la cría y obtención de la serie entomológica, es decir, exuvia de larva IV, exuvia de pupa y adulto. Posteriormente se realizaron

los montajes permanentes en bálsamo de canadá para la determinación taxonómica de las especies.

4.3.2 Determinación taxonómica

La determinación taxonómica de los ejemplares se realizó utilizando las claves de Linthicum (1988), Faran (1980), Faran y Linthicum (1981), Rubio-Palis (2000) y González y Carrejo (2007). Los especímenes obtenidos a partir de las series entomológicas se determinaron utilizando la morfología de las exuvias de las larvas IV estadio, pupas y los adultos. Para *An. costai* se revisó la morfología de la genitalia del macho.

4.3.3 Confirmación molecular de las especies

Para la confirmación taxonómica de las especies se utilizó la secuencia de nucleótidos del espaciador transcrito intergénico dos (ITS2) del ADN ribosomal y del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) obtenidas a partir de los mosquitos adultos de las series entomológicas. El ADN genómico fue extraído utilizando el protocolo descrito en el manual del kit de QIAgen DNeasy Blood and Tissue (QIAgen, Crawley, United Kingdom). La amplificación de la región del ITS2 fue realizada empleando el protocolo descrito por Li y Wilkerson (2005) donde se utilizan como iniciadores las secuencias conservadas de las subunidades 5.8S y 28S: ITS2F:5´-TGTGAACTGCAGGACACATGAA-3´(forward) e ITS2R:5´-ATGCTTAAATTTAGGGGGTAGTC-3´(reverse). La reacción de amplificación fue realizada en un volumen final de 25µl, utilizando kit Ready –To-Go-PCR bead (Amersham Pharmacia/Biotech, Piscataway, NJ, USA). Se empleó un termociclador PTC-200 (BioRad, Inc., Hercules. CA) con los siguientes parámetros: Denaturación inicial 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de amplificación (30s a 95°C, 30s a 56°C y 1 min a 72°C), seguidos de una extensión final a 72°C por 10 min. Las secuencias obtenidas en las dos direcciones fueron realizadas por el Molecular Genetics Core del Wadsworth

Center (Departamento de Salud del estado de Nueva York). Las secuencias de ITS2 fueron editadas con el programa Sequencher 3.0 y posteriormente comparadas con las disponibles en el GenBank utilizando BLAST (Zhang *et al.,* 2000) (Disponible en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Para el caso del segundo marcador, se utilizó la secuencia completa del gen de la COI. La extracción se realizó con el kit antes descrito y la amplificación siguiendo el protocolo de Lehr *et al*. (2005), el cual emplea dos pares de iniciadores. Para la región N-terminal el TY-J-1400: 5´-TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC-3´ y UEA-6:5´-TTAATTCCTGTAGGNACAGCAATAATTAT-3´, y para la región COOH-terminal el C1-J-2195: 5´-TGATTYTTTGGTCATCCNGAAGT-3´y el TL2-N-3014:5´-AATGCACTAATCTGCCATATTAG-3´. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µl, utilizando el kit Ready–To-Go-PCR bead (Amersham Pharmacia/Biotech, Piscataway, NJ, USA), aproximadamente 1/100 de ADN del mosquito y 20µM de cada iniciador. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 (BioRad, Inc., Hercules. CA) con los siguientes parámetros: denaturación inicial 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 95°C, 1 minuto a 53°C y 1 minuto a 72°C). Los fragmentos fueron secuenciados en las dos direcciones por el Molecular Genetics Core del Wadsworth Center (Departamento de Salud del estado de Nueva York). Las secuencias del gen completo fueron compiladas, editadas y alineadas con ayuda del Sequencher 3.0 y posteriormente comparadas con las disponibles en en el GenBank. Adicionalmente, fueron enviadas al Museo de Historia Natural de Londres para ser comparadas con las secuencias incluidas en la base de datos del Mosquito Barcode Iniciative (MBI).

4.4 Detección de infección natural por Plasmodium **spp.**

Después de realizar la identificación taxonómica de los mosquitos adultos recolectados con atrayente humano, se separó la cabeza y el tórax de cada uno de ellos y se procesaron para la detección la proteína circunsporozoito (CS) de *P. falciparum, P. vivax* VK210 y *P. vivax* VK247 de forma individual. Se siguió el protocolo estandarizado (Wirtz *et al*., 1985, 1987) que utiliza el kit de Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) distribuido por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC, Atlanta, EU).

4.5 Análisis de datos

La tasa de picadura fue expresada como el promedio geométrico de picaduras de hembras por persona por noche. Para la caso de la actividad de picadura horaria esta fue expresada como el promedio geométrico de picaduras de hembras por persona por hora. La infección natural fue calculada como el porcentaje de mosquitos infectados para cada especie de *Anopheles* con cada una de las especies de parásitos de *Plasmodium* identificadas. La tasa de inoculación entomológica fue calculada como el producto de la tasa de picadura por la razón de infección obtenida en cada localidad de estudio.

5 Resultados

5.1 Determinación taxonómica de las especies de Anopheles

Se identificaron 5.215 mosquitos a partir del material entomológico recolectado en los sitios de cría (n=1.548) y con atrayente humano protegido (n=3.667). De los 3.667 mosquitos capturados con atrayente humano en cinco municipios de este departamento, se identificaron 9 especies del género *Anopheles* siendo *An*. *darlingi* la más abundante (n=3.489). Se recolectaron adicionalmente especímenes de *An. marajoara* (n=91), *An. oswaldoi* B (n=25), *An. braziliensis* (n=25), *An. rangeli* (n=20), *An. costai* (n=9), *An. triannulatus* s.s. (n=6), *An. peryassui* (n=1) y *An. neomaculipalpus* (n=1) (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de las especies de *Anopheles* recolectadas con atrayente humano en los municipios del departamento del Meta entre julio 2007 y diciembre de 2008 (No se realizaron capturas con atrayente humano protegido en San Martín) (n=número de individuos, N=número de noches).

Especie	Granada N =4		Villavicencio N =31		Puerto Concordia N =3		Fuente de Oro N =3		Vista Hermosa N =3		Total N =44	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
An. darlingi	107	96,40	3034	95,59	288	99,31	36	100	24	42,11	3489	95,15
An. rangeli	-	-	20	0,63	-	-	-	-	-	-	20	0,55
An. marajoara	-	-	90	2,84	-	-	-	-	1	1,75	91	2,48
An. peryassui	1	0,90	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,03
An. braziliensis	2	1,80	20	0,63	2	0,69	-	-	1	1,75	25	0,68
An. costai	1	0,90	8	0,25	-	-	-	-	-	-	9	0,25
An. neomaculipalpus	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,75	1	0,03
An. oswaldoi B	-	-	-	-	-	-	-	-	25	43,86	25	0,68
An. triannulatus s.s.	-	-	1	0,03	-	-	-	-	5	8,77	6	0,16
TOTAL	111	100	3173	100	290	100	36	100	57	100	3667	100

En los 6 municipios de estudio se revisaron 101 sitios de cría distribuidos de la siguiente manera: Fuente de oro (8), Granada (47), Puerto Concordia (5), San Martín (7), Villavicencio (30) y Vista Hermosa (5) a partir de los cuales se recolectaron las larvas para la obtención de 1.548 series entomológicas. *An.*

darlingi (n=481) fue la especie con mayor distribución dado que se encontró en estadio larval en todos los municipios incluidos en el estudio. Las especies, aunque recolectados un menor número de individuos, que presentaron una amplia distribución fueron *An. triannulatus* s.l. (5 municipios), *An. rangeli* (5) *An. marajoara*, (4). Algunas de las especies como *An. pseudopunctipennis* s.l. (2), *An. peryassui* (1) y *An. nimbus* (1) presentaron una distribución más restringida (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de las especies de *Anopheles* obtenidas a partir de las series entomológicas del material recolectado en el departamento del Meta entre julio de 2007 y diciembre de 2008 (n=número de series entomológicas, N=número de sitos de cría revisados).

Especie	Granada N=47		Villavicencio N=29		Puerto Concordia N=5		San Martín N=7		Fuente de Oro N=8		Vista Hermosa N=5		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
An. darlingi	181	39,0	148	42,2	18	41,9	60	15,2	73	29,0	1	2,4	481	31,1
An. rangeli	87	18,8	76	21,7	9	20,9	1	0,3	74	29,4	-	-	247	16,0
An. marajoara	85	18,3	124	35,3	-	-	135	34,1	7	2,8	-	-	351	22,7
An. peryassui	38	8,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38	2,5
An. oswaldoi B	26	5,6	-	-	-	-	-	-	56	22,2	39	92,9	121	7,8
An. braziliensis	13	2,8	2	0,6	-	-	192	48,5	-	-	-	-	207	13,4
An. pseudopunctipennis s.l.	12	2,6	-	-	-	-	-	-	37	14,7	-	-	49	3,2
An. triannulatus s.s.	9	1,9	1	0,3	-	-	6	1,5	1	0,4	2	4,8	19	1,2
An. argyritarsis	8	1,7	-	-	-	-	2	0,5	1	0,4	-	-	11	0,7
An. costai	5	1,1	-	-	3	7,0	-	-	3	1,2	-	-	11	0,7
An. nimbus	-	-	-	-	13	30,2	-	-	-	-	-	-	13	0,8
TOTAL	464	100	351	100	43	100	396	100	252	100	42	100	1548	100

5.2 Confirmación taxonómica de las especies

A partir del material entomológico recolectado en los seis municipios se confirmaron 12 especies de *Anopheles,* las cuales fueron identificadas con la utilización de caracteres morfológicos de adultos y estadios inmmaduros y el análisis de las secuencias del gen de la COI y del ITS2. Con respecto a las especies que hacen parte de complejos se confirmó la presencia de *An. marajoara* (complejo *Albitarsis*), *An. oswaldoi* B (complejo *Oswaldoi)*, *An. triannulatus* s.s. (complejo de *Triannulatus*). Se identificaron especímenes del complejo de *An. pseudopunctipennis*, sin embargo, las metodologías

empleadas y la información disponible no permitieron establecer a cuál de los miembros de complejo pertenece (Tabla 5). Para el caso de *An. marajoara*, se comparó adicionalmente la secuencia de ITS2 con la de *An. albitarsis* F, disponible en el Gen Bank, obteniendo un porcentaje de homología del 95% (Puerto Carreño, Colombia; DQ228315.1; Brochero y Wilkerson*.,* 2007).

Tabla 5. Porcentaje de homología de las secuencias de ITS2 y COI de las especies de *Anopheles* recolectadas en el departamento del Meta con las secuencias disponibles en el GenBank (*Secuencia no disponible en bases de datos, **especie confirmada por ITS2, ***Secuencia disponible MBI, confirmada por Yvonne Linton, Museo de Historia Natural, Londres, Inglaterra).

Especie identificación morfológica	No. de ejemplares secuenciados (ITS2)	No. de identificación de la secuencia	% de identidad	País de Procedencia	No. de ejemplares secuenciados (COI)	No. de identificación de la secuencia	% de identidad	País de Procedencia	Especie confirmada con los alineamientos
An. argyritarsis	2	AY849553	99	Mérida, Venezuela	2	MBI(8)	-	-	*An. argyritarsis*
An. braziliensis	3	AF461753 U92336	98 99	Rondônia, Brasil Sin información	3	MBI(7) DQ076237-38	- 98	Colombia Amapá, Brasil	*An. braziliensis*
An. costai	2	AF462379	98	Rondônia, Brasil	2	MBI(2)	-	-	*An. mediopunctatus*** *An. costai* ***
An. darlingi	1	AF462388	99	Acre, Brasil	1	DQ076235-6	98	Amapá, Brasil	*An. darlingi*
An. Marajoara	3	AY028127	99	Chocó, Colombia	3	AF417699 DQ076225.1 MBI (1)	96 95 -	Brasil Brasil -	*An. marajoara*
An. Nimbus	1	*	-	-	1	*	-	-	-
An. oswaldoi	0	*	-	-	9	MBI	-	Colombia	*An. oswaldoi* B***
An. peryassui	1	AF461755	99	Rondonia, Brasil	1	MBI (5)	-	Colombia	*An. peryassui*
An. Pseudopunctipennis	3	U49735	97	-	2	MBI (4)	-	Colombia	*An. pseudopunctipennis* s.l.
An. rangeli	6	DQ666910	99	Putumayo, Colombia	5	MBI	-	Putumayo, Colombia	*An. rangeli*
An. triannulatus	3	U92331	98	-	3	MBI	-	Putumayo, Colombia	*An. triannulatus* s.s.***

5.3 Identificación de los sitios de cría para las especies de Anopheles

Para la identificación de los sitios de cría se establecieron cinco categorías: caño (incluyó corrientes de agua naturales y artificiales), laguna, pantano (incluye potrero inundado temporalmente), estanque piscícola y pozo (agua estancada, sin corriente). Se determinó la presencia de las especies de *Anopheles* en cada una de las categorías de criaderos identificadas en los 6 municipios de estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Presencia de las especies de *Anopheles* en los 101 criaderos, indicando preferencias por tipo de hábitat (N= número de criaderos revisados para cada tipo; n=número de series obtenidas por especie).

Especie/ Tipo de criadero	Caño N=28		Laguna N=12		Pantanos N=32		Estanque piscícola N=22		Pozo N=7		Total N=101
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
A. darlingi	217	45	73	15	127	26	36	7	28	6	481
A. marajoara	50	14	103	29	96	27	100	28	2	1	351
A. rangeli	132	53	2	1	40	16	52	21	21	9	247
A. braziliensis	2	1	187	90	18	9	0	0	0	0	207
A. oswaldoi B	72	60	32	26	5	4	12	10	0	0	121
A. pseudopunctipennis s.l.	1	2	0	0	1	2	47	96	0	0	49
A. peryassui	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	38
A. triannulatus s.s.	3	16	2	11	7	37	7	37	0	0	19
A. Nimbus	13	100	0	0	0	0	0	0	0	0	13
A. costai	5	45	0	0	5	45	0	0	1	9	11
A. argyritarsis	1	9	2	18	6	55	2	18	0	0	11

Las larvas de *An. darlingi* (n= 481) fueron recolectadas en las cinco categorías de sitios de cría, caños (45%), pantanos (26%), lagunas (15%), estanques piscícolas (7%) y pozos (6%) (Tabla 6), donde el porcentaje de sombra osciló entre 0-95%. Estuvo asociada con mayor frecuencia a *An. marajoara, An. rangeli* y *An. oswaldoi* B.

An. marajoara (n= 351), fue encontrada en lagunas (29%), estanques piscícolas (28%) y pantanos temporales (27%) (Tabla 6) donde el porcentaje de sombra

no superó el 30%. Se encontró asociada a *An. darlingi*, *An. rangeli*, *An. braziliensis* y *An. argyritarsis*.

Para el caso de los estadios inmaduros de *An. rangeli* (n= 247), estos fueron recolectados en caños (53%), estanques piscícolas (n=21) y pantanos (n=16) (temporales) y donde los porcentajes de sombra fueron inferiores al 50%. En las localidades de estudio se encontró asociada a *An. darlingi, An. marajoara, An. oswaldoi* B y *An. pseudopunctipennis* s.l. (Tabla 4 y 6).

An. braziliensis (n= 207) recolectada en lagunas (90%) y potreros inundados incluidos en la categoría de pantanos (9%), los especímenes de esta especie fueron capturados junto con *An. marajoara, An. argyritarsis* y *An. darlingi* (Tabla 6).

Para *An. oswaldoi* B (n= 121) los principales sitios de cría fueron hábitats naturales tales como caños (60%) y lagunas (26%), aunque también se encontraron larvas en menor número en estanques piscícolas (10%) localizados en áreas periurbanas (Tabla 6). Esta especie puede estar presente en criaderos parcialmente sombreados a expuestos. Se encontró principalmente junto con *An. darlingi*, *An. marajoara* y *An. rangeli*.

Las larvas de especímenes pertenecientes al complejo de *An. pseudopunctipennis* (n= 49) fueron recolectadas principalmente en estanques piscícolas (96%) asociadas con *An. darlingi* y *An. rangeli*. Para el caso de *An. peryassui* (n= 38) esta especie se recolectó en únicamente en pantanos, particularmente en potreros inundados asociado con *An braziliensis*, *An. argyritarsis* y *An. marajoara* (Tabla 6).

Entre las especies recolectadas con menor frecuencia están *An. triannulatus* s.l. que se encontró junto con *An. marajoara*, *An. braziliensis, An. rangeli* y *An.*

darlingi en criaderos naturales y artificiales que incluyeron principalmente pantanos y estanques piscícolas. *An. nimbus* (n=13) la cual se encontró asociada con *An. costai* en caños con 100% de sombra, localizados en un ambiente selvático del municipio de Puerto Concordia. Para el caso de *An. costai* (n= 11), las larvas se encontraron en caños (45%) y pantanos (45%) con sombra por encima del 95%, asociadas con *An. darlingi*, *An. nimbus*, *An. oswaldoi* B y *An. rangeli*. Los especímes de *An. argyritarsis* (n= 11) fueron recolectados en pantanos (55%), lagunas (18%) y estanques piscícolas (18%) se encontró asociada con *An. marajoara* y *An. braziliensis* (Tabla 6).

5.4 Caracterización del comportamiento de picadura de las especies de Anopheles

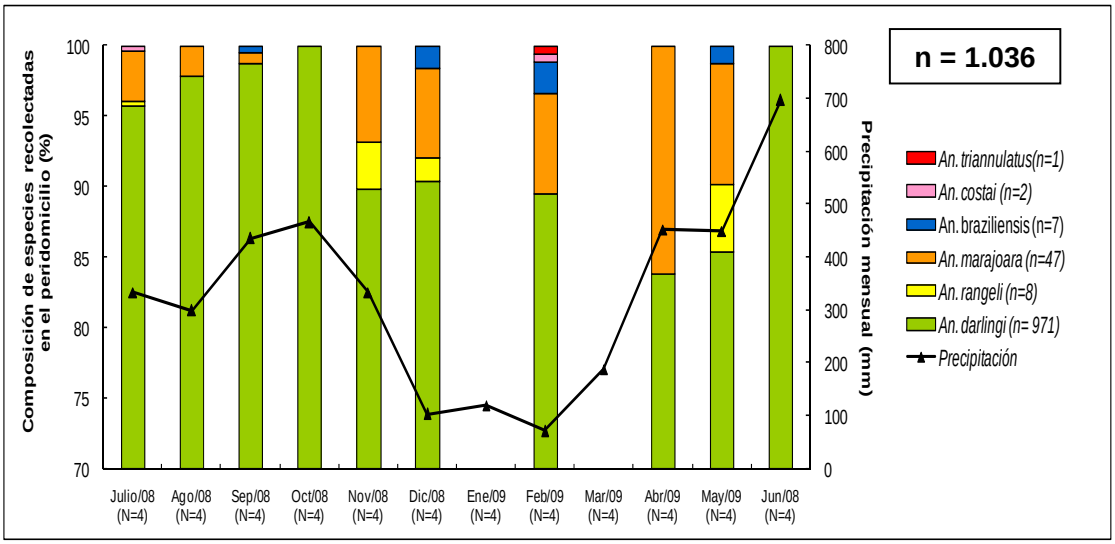
En el estudio de caracterización de comportamiento de picadura de las especies de *Anopheles* se encontró que en las capturas realizadas con atrayente humano protegido en los cinco municipios de estudio la especie más abundante fue *An. darlingi*, Fuente de Oro, 100%, Granada, 96.4%, Villavicencio, 95,6% y Vista Hermosa, 42,1% (Tabla 3). Estas observaciones permitieron establecer que esta especie permanece activa durante toda la noche con un comportamiento exofágico principalmente. Las bajas densidades registradas, no permitieron obtener una información confiable para definir patrones de comportamiento en las localidades muestreadas de estos cuatro municipios, sin embargo, se evidenciaron máximos de actividad entre las 18:00 y las 19:00 h en Granada y Fuente de Oro y entre las 20:00 a las 23:00 h en Fuente de Oro y Vista Hermosa. Adicionalmente, en la localidad de Vista Hermosa se presentó otro valor máximo entre la 1:00 y las 2:00 h en el peridomicilio y de 3:00 a 4:00 h en el intradomicilio exhibiendo *An. darlingi* en esta localidad un patrón bimodal.

5.4.1 Detección de variación estacional en el comportamiento de las especies de *Anopheles*

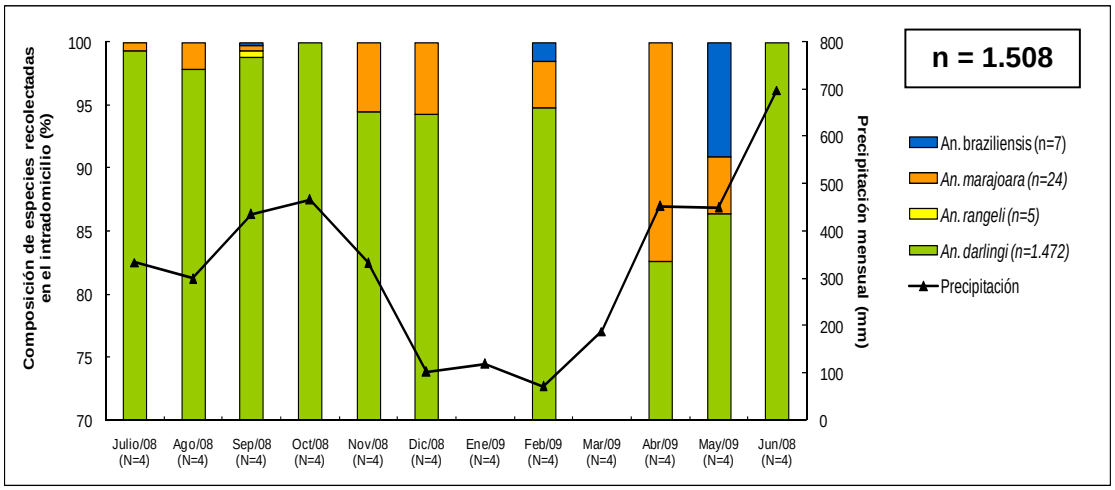
En el municipio de Villavicencio, se realizó la actividad de picadura diaria para *An. darlingi* entre julio de 2008 y junio de 2009 para un total 34 noches distribuidas en 10 meses de observación. Durante este periodo de tiempo se recolectaron con atrayente humano 2.544 mosquitos. Se identificaron seis especies del género *Anopheles* siendo *An. darlingi* (n= 2.443) la especie más abundante con un 96% del total de la población capturada. Adicionalmente, se identificaron *An. marajoara* (n=71), *An. braziliensis* (n=14), *An rangeli* (n=13), *An. costai* (n=2) y *An. triannulatus* (n=1).

Para explicar la variación mensual de la abundancia relativa de cada una de las especies de *Anopheles* ésta se relacionó con la precipitación para cada uno de los diez meses de observación, medida en una estación climatológica instalada en la vereda Apiay, Villavicencio.

En el peridomicilio se estableció que durante los meses con mayor precipitación, octubre de 2008 y junio de 2009, la especie predominante fue *An. darlingi*. En los periodos de transición y niveles bajos de precipitación, aumentó el número de individuos de *An. marajoara, An. rangeli, An. braziliensis, An. triannulatus* y *An. costai* capturados en este hábitat. Con respecto al intradomicilio se observó un comportamiento similar con un aumento del número de mosquitos de *An. marajoara* y *An. braziliensis* principalmente (figura 6).



Peridomicilio



Intradomicilio

Figura 6. Distribución mensual de las especies de *Anopheles* recolectadas con atrayente humano entre julio de 2008 y junio de 2009 (N=tamaño de muestra, n= número de individuos).

La distribución temporal de la tasa de picadura de *An. darlingi*, observada para cada uno de los meses, mostró un patrón bimodal. Al relacionar este comportamiento con la precipitación mensual se observó que esta especie es más abundante en el mes de febrero que corresponde con el periodo seco y julio que corresponde con un periodo de transición entre la época de lluvias y la

época seca. En los meses de abril, mayo y junio donde se presenta un aumento de la precipitación fueron los meses donde se capturó el menor número de individuos (Figura 7). Esta especie presentó en Villavicencio un comportamiento endofágico y exofágico con un total de 1.472 mosquitos capturados en el intradomicilio y 971 el peridomicilio. Se obtuvo para este municipio una tasa de picadura promedio de 16,8 hembras/persona/noche, con valores que oscilaron entre 4,2 y 56,7 hembras/persona/noche. No se presentó diferencia entre la tasa de picadura obtenida en el intradomicilio y el peridomicilio para cada uno de los meses de observación (Prueba de Mann-Whitney: *W*=47; *P=0.59; n*ivel de confianza 95%).

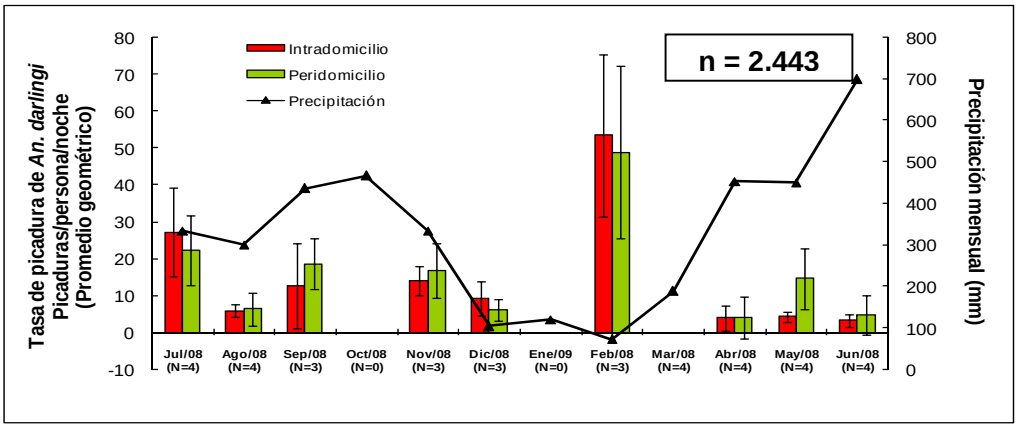


Figura 7. Comportamiento de la tasa de picadura mensual de *An. darlingi* y la precipitación registrada por Secretaría de Salud del Meta entre julio de 2008 y junio de 2009 en la estación de Apiay, Villavicencio (Promedio geométrico de la tasa de picadura, Intervalo de confianza del 95%). Los meses de octubre de 2008 y enero y marzo de 2009 no se realizaron capturas de mosquitos. (N=tamaño de muestra, n= número de individuos).

La realización del estudio de cambios estacionales, por espacio de diez meses, permitió determinar que *An. darlingi* presenta diferentes patrones de actividad de picadura en cada uno de los meses de observación. De forma general se estableció que estuvo presente en el intradomicilio y el peridomicilio durante toda la noche. Se detectó un máximo de actividad en el intradomicilio entre las 18:00 y 19:00 h y entre las 21:00 y las 23:00 h. Para el peridomicilio se presentó entre las 18:00 y las 19:00 h con un descenso a lo largo de la noche (Figura 8).

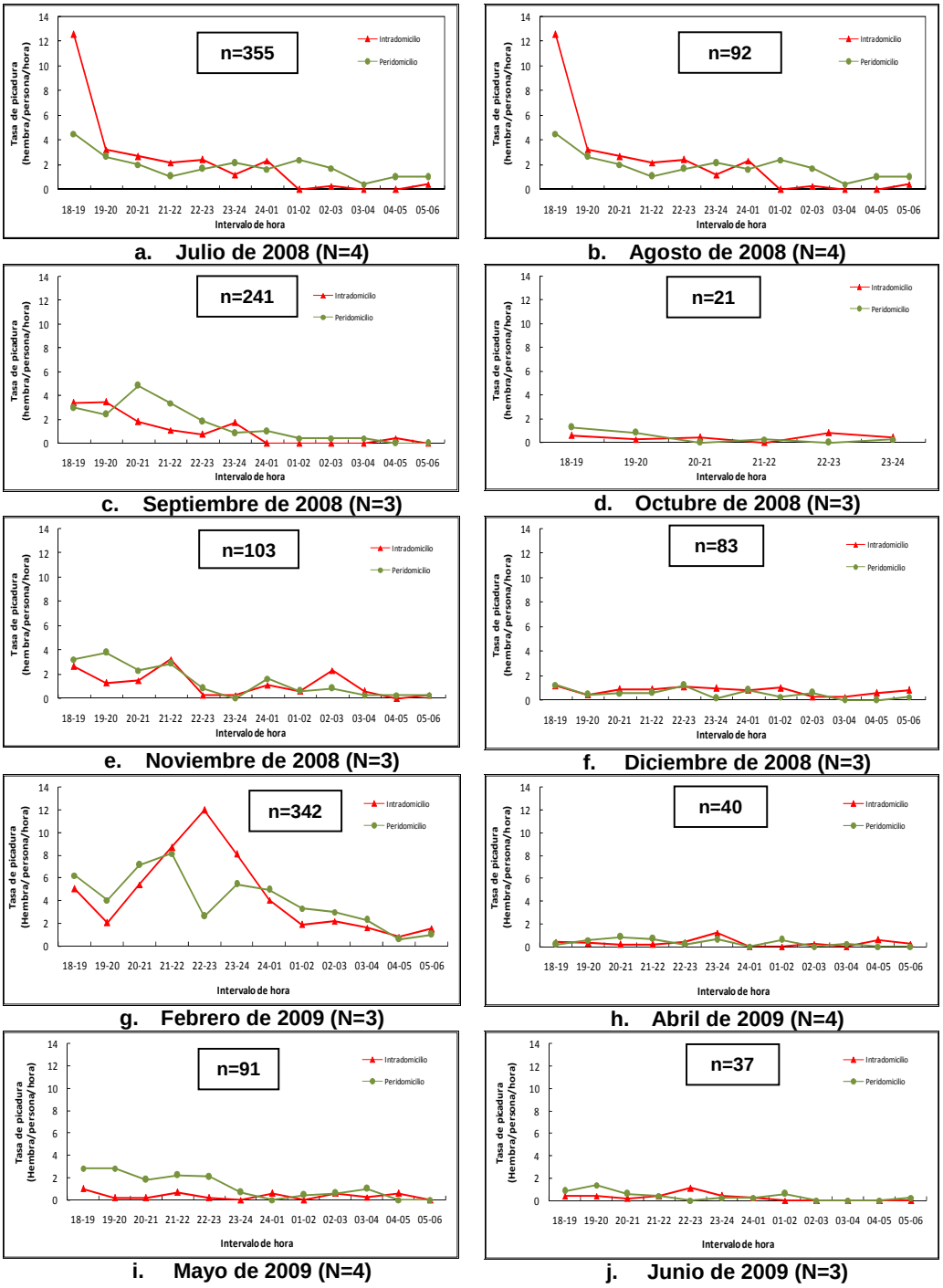


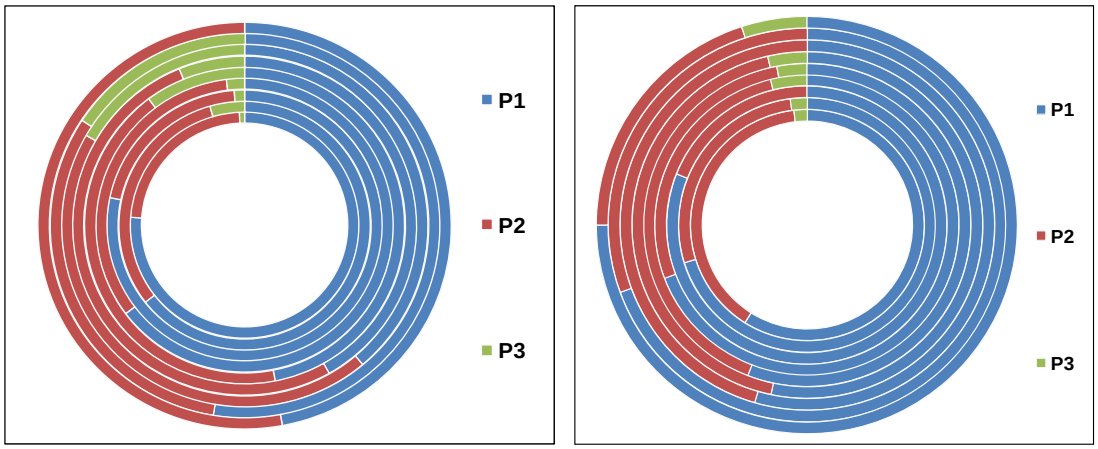
Figura 8. Patrones de actividad de picadura de *An. darlingi* observados en Quintas de San Fernando, vereda Apiay, Villavicencio entre julio de 2008 y junio de 2009 (n=número de individuos, N=número de noches).

Para establecer el nivel de exposición que pudieran tener los humanos a las picaduras de *An. darlingi* se analizaron los hábitos de picadura del mosquito por períodos, asumiendo un primer período en las primeras horas de la noche, cuando probablemente las personas se encuentran expuestas en el intradomicilio y peridomicilio, un segundo período durante la noche, cuando probablemente las personas están durmiendo, y un tercer período a la madrugada, cuando probablemente algunas personas inician sus actividades. Para este fin se definieron tres periodos establecidos de acuerdo con los hábitos observados en la población: periodo 1 (P1) entre las 18:00-22:00h (cuatro horas); periodo 2 (P2) entre las 22:00-4:00 h (seis horas) y periodo 3 (P3) entre las 04:00-06:00 h (tres horas). Cada círculo concéntrico representa un mes de observación, siendo el interno julio de 2008 y el externo junio de 2009 (Figura 9). Para cada uno de los meses, el porcentaje de contribución relativa se expresó como la proporción de mosquitos recolectados por periodo con respecto al total de los mosquitos capturados entre las 18:00 h y las 6:00 h durante tres a cuatro noches del muestreo mensual.

Para el intradomicilio se observa, que durante el P1, los valores de porcentaje de contribución oscilan entre 38,9 y 78.3% con un valor promedio de 57%. Para P2 los valores oscilan entre 20,5 y 52,9% con un valor promedio de 37% y para P3 oscila entre 0 y 16,7% con un valor promedio de 6,4% (Tabla 7). Adicionalmente, se observó en el intradomicilio, una mayor actividad en el primer periodo durante el segundo semestre de 2008, donde los valores de porcentaje de contribución estuvieron por encima de 64% comparado con el primer semestre de 2009 donde la actividad de *An. darlingi* disminuyó.

Para el peridomicilio, se obtuvo, que durante P1, los valores de porcentaje de contribución oscilan entre 53,3 y 81% con un promedio de 65,3%. Para P2 los valores oscilan 19 y 45,5% con valor promedio 33% y para P3 oscila entre 0 y 5,0% con un valor promedio de 2,2% (Tabla 7).

No se observaron diferencias significativas entre los valores de porcentaje de contribución obtenidos en el intradomicilio y el peridomicilio para cada uno de los periodos **P1** (t=-1,98, p=0.08), **P2** (t=0,98, p=0.355) y **P3** (t=1,66, p=0.14). Al comparar los valores obtenidos para los periodos P1 y P2 se estableció que para el intradomilicio no existen diferencia significativa (t=2.34, p=0.05), sin embargo en el caso del peridomicilio se estableció que existe diferencia entre los dos periodos de tiempo (t=4,93, p=0.001).



a. Intradomicilio **b. Peridomicilio**

Figura 9. Variación en el porcentaje de contribución de la actividad de picadura de *An. darlingi* en tres periodos de la noche. P1 18:00-22:00 h; P2 22:00-4:00 h; P3 04:00-06:00 h.

Sitio	Intradomicilio			Peridomicilio		
Mes	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Julio/08	76,1	23,2	0,7	59,0	39,9	1,9
Agosto/08	64,4	31,1	4,4	70,2	27,7	2,1
Septiembre/08	78,3	20,5	1,2	81,0	19,0	0,0
Noviembre/08	64,7	33,3	2,0	69,2	26,9	3,8
Diciembre/08	46,9	42,9	10,2	55,9	41,2	2,9
Febrero/09	41,8	52,0	6,2	53,3	43,0	3,6
Abril/09	38,9	44,4	16,7	54,5	45,5	0,0
Mayo/09	52,6	31,6	15,8	69,4	30,6	0,0
Junio/09	47,1	52,9	0,0	75,0	20,0	5,0

Tabla 7. Porcentajes de contribución de la actividad de picadura de *An. darlingi* en tres periodos de la noche, P1: 18:00-22:00; P2: 22:00-4:00; P3: 04:00-06:00.

Para las especies recolectadas en menor proporción en las capturas con atrayente humano, durante el estudio de caracterización del comportamiento de picadura y variación estacional, se muestra una tendencia en los hábitos de picadura, sin una diferenciación espacial y temporal.

Se observó para *An. marajoara* (n=90) que está presente durante toda la noche con tasas de picadura de 0,7 y 1,17 hembras/persona/noche en el intradomicilio y el peridomicilio respectivamente. Mostró un máximo de actividad entre las 18:00 y las 22:00 h, tiempo en el que se recolectó el 60% de los mosquitos en el intradomicilio y el 81% en el peridomicilio. Se destacó el pico de actividad entre las 18:00 y 19:00 h en el peridomicilio con el 48,3% de los mosquitos capturados (Tabla 8, Figura 10).

Tabla 8. Porcentaje de contribución determinado para *An. marajoara* en Villavicencio (Julio/2007-junio/2009).

Sitio	18-19	19-20	20-21	21-22	22-23	23-24	24-01	01-02	02-03	03-04	04-05	05-06
Intradomicilio	18,8	21,9	9,4	18,8	3,1	15,6	3,1	0,0	3,1	3,1	3,1	0,0
Peridomicilio	48,3	12,1	12,1	8,6	5,2	1,7	3,4	1,7	3,4	1,7	1,7	0,0

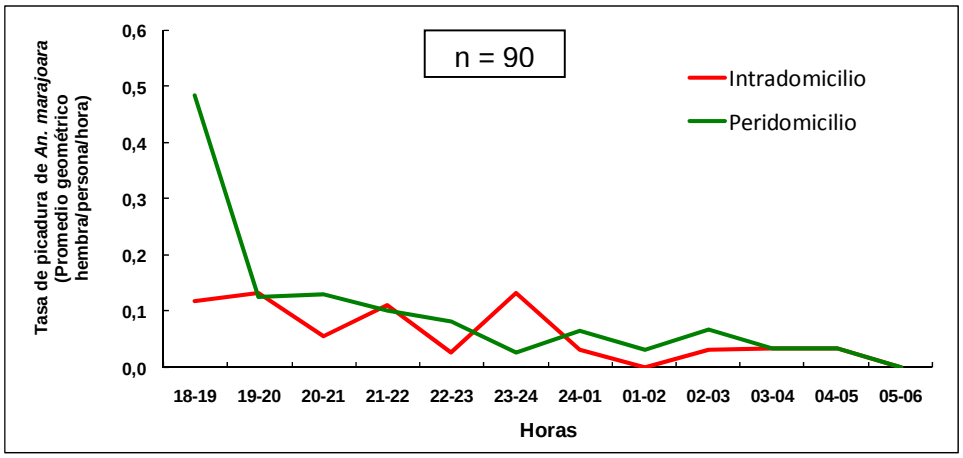


Figura 10. Actividad de picadura de *An. marajoara*, Villavicencio (Entre julio de 2007 y junio de 2009; N=34 noches).

En Los Alpes, Vista Hermosa, *An. oswaldoi* B (n=25), presentó un comportamiento principalmente exofágico, donde la tasa de picadura presentó valor promedio de 2,1 hembras/persona/noche, mientras que en el intradomicilio no superó las 0,3 hembras/persona/noche. En el peridomicilio exhibió dos periodos con mayor actividad, entre las 18:00 y las 20:00 h, periodo donde se captura el 73.9% del total de los mosquitos recolectados para esta especie, y entre las 23:00 y 24:00 h. Presenta un pico de actividad en el intradomicilio entre las 22:00 y 23:00 h (Tabla 9, Figura 11).

Tabla 9. Porcentaje de contribución determinado para *An. oswaldoi* en la localidad de Los Alpes, Vista Hermosa (octubre de 2008).

[redacted]

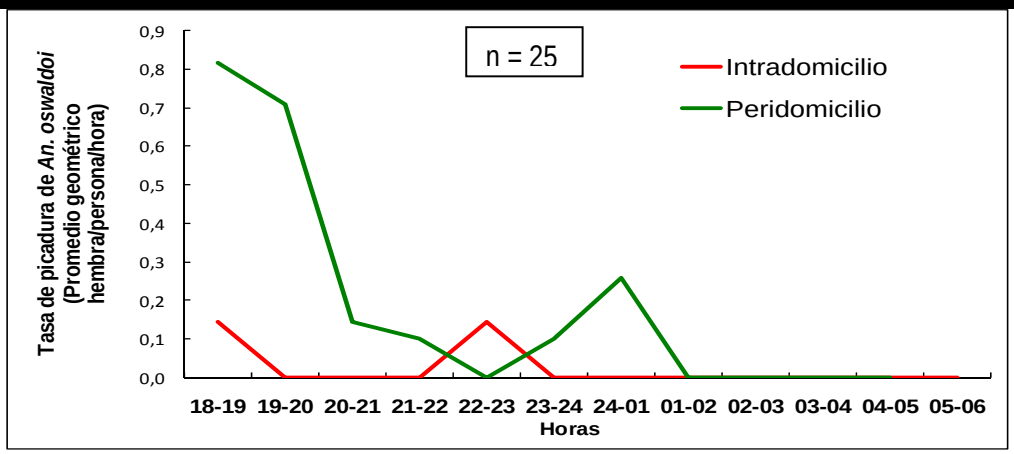


Figura 11. Actividad de picadura de *An. oswaldoi* B en la localidad de Los Alpes, Vista Hermosa (octubre de 2008) (N=3).

An. rangeli (n=20) se capturó con atrayente humano únicamente en Villavicencio donde la intensidad de muestreo fue mayor (N=34). Exhibió un comportamiento principalmente exofágico aunque también fue recolectada al interior de la vivienda. No estuvo presente toda la noche y su actividad

hematofágica se restringió a las primeras horas de la noche, 18:00 a 21:00 h periodo en el que se recolectó el 100% de los mosquitos de esta especie.

An. braziliensis (n=20), estuvo presente durante toda la noche, aunque se observaron variaciones a lo largo de las 12 horas. Presentó tres picos de actividad, el primero entre las 18:00 y las 20:00 h en el intradomicilio y el peridomicilio, el segundo hacia la media noche, 23:00-24:00 h en el intradomicilio, y el tercero al amanecer, de las 05:00 a las 06:00 h en el intradomicilio y el peridomicilio**.**

Para *An. costai* (n=8), dados el número reducido de individuos se puede decir que se alimenta en humanos, se capturó únicamente en el peridomicilio entre las 18:00 y 19:00 h.

De las especies restantes, capturadas en menor proporción se tiene que *An. triannulatus* s.s. (n=6) se capturó únicamente en el peridomicilio entre las 18:00 y las 20:00 h. Para *An. neomaculipalpus* (n=1) y *An. peryassui* (n=1), poco representadas en las capturadas con atrayente humano solo es posible decir que incluyen hombre como fuente de alimento sanguíneo.

5.5 Infección natural y tasa de inoculación entomológica (TIE)

Se procesaron 2.127 mosquitos para detección de infección natural por *P. falciparum*, *P. vivax* VK247 y *P. vivax* VK210: *An. darlingi* (n=2.063), *An. marajora* (n=47), *An. rangeli* (n=5), *An. braziliensis* (n=9), *An. costai* (n=2) y *An. triannulatus* (n=1). En el municipio de Villavicencio se encontró infectado *An. darlingi* (1/2.063) con *P. falciparum* para una tasa de infección de 0.05%. El mosquito infectado fue capturado durante el mes de septiembre de 2008 entre las 18:00-19:00 h en el intradomicilio.

La tasa de inoculación entomológica (TIE), dada como el número de picaduras infectivas recibidas por una persona en un año, se calculó para Villavicencio a partir de la tasa de picadura promedio de 16,8 picaduras/persona/noche registrada en 31 noches de captura y la tasa de infección por *P. falciparum* obtenida para *An. darlingi*. Se calculó que una persona recibe al año un total 6.147,6 picaduras de *An. darlingi* con este valor se estimó que una persona puede recibir 3.0 picaduras infectivas por año.

6 Discusión de resultados

La identificación de las especies del género *Anopheles* presentes en el departamento del Meta, junto con la información epidemiológica, la detección de infección con especies de *Plasmodium* y la caracterización del comportamiento permite establecer las especies involucradas en la transmisión con el fin de seleccionar adecuadamente las medidas para el control de la malaria en esta región del país.

Durante este estudio, la utilización de taxonomía clásica y el análisis de las secuencias de nucleótidos de los marcadores moleculares ITS2 y COI permitió identificar 12 especies de *Anopheles*. Sin embargo, a partir de las capturas con atrayente humano se determinó que solo nueve de ellas incluyen al hombre como fuente de alimento sanguíneo. Entre éstas la especie más abundante fue *An. darlingi*, seguida por *An. marajoara*, *An. oswaldoi* B, *An. braziliensis*, *An. rangeli*, *An. costai*, *An. triannulatus* s.s., *An. peryassui* y *An. neomaculipalpus*. Entre las recolectadas únicamente en los sitios de cría se tienen *An. nimbus, An. argyritarsis* y *An. pseudopunctipennis* s.l.

An. darlingi es un eficiente vector de malaria en América, particularmente en el departamento del Meta los estudios de comportamiento, epidemiológicos y los hallazgos de infección lo confirmaron como el principal vector de *P. falciparum* y *P. vivax* (De Zulueta, 1950; Bates y Zulueta, 1949; Herrera *et al., 1987;* Olano *et al*., 2001). Esta especie presentó una amplia distribución en el departamento del Meta dado que se encontró en estadio larval y en capturas de adultos en las seis áreas de estudio. Anteriormente, había sido registrada en 13 de los 29 municipios del departamento (Gast, 1943; Renjifo, 1948; Bates y Zulueta, 1949; Renjifo y Zulueta 1974; Faran, 1980; Brochero *et al*., 2005; González y Carrejo, 2007). Este trabajo permitió ampliar los registros a Puerto Concordia y Vista Hermosa.

An. darlingi se presentó en diversos sitios de cría que incluyeron ambientes naturales y artificiales que en ocasiones estuvieron completamente expuestos al sol, sin embargo, la vegetación circundante o emergente siempre estuvo presente para proporcionar el refugio necesario que se ha establecido asegura la sobrevivencia de las larvas (Orr y Resh, 1989). Estas observaciones permitieron confirmar la capacidad de adaptación de *An. darlingi* a los ambientes modificados y la posibilidad que tiene de colonizar diferentes sitios de cría, principalmente en las áreas periurbanas, características que se ha observado favorecen la proliferación y la presencia de ésta especie durante todo el año aumentando el riesgo de exposición de la población humana a su picadura (Pinedo-Cancino e*t al*., 2006, Vittor *et al*., 2006, Singer y De Castro, 2006; Sallum *et al*., 2008).

La caracterización del comportamiento de picadura realizado en las áreas de trabajo y particularmente durante el estudio longitudinal desarrollado en Villavicencio, permitió observar que *An. darlingi* está presente durante toda la noche en el intradomicilio y peridomicilio confirmando el hábito exofágico y endofágico ya descrito para esta especie (Acosta, 1969; Elliott, 1972; Forattini, 1987; Charlwood, 1980, Rubio-Palis, 1995; Rubio-Palis, 2000). Adicionalmente, se determinó que esta especie exhibe diferentes patrones de comportamiento de picadura que dependen de la densidad. En los meses donde la población es baja, las tasas de picadura son relativamente constantes durante la noche y para los meses donde la densidad es mayor se observan valores máximos entre las 18:00 y las 19:00 h y entre las 21:00 y las 24:00 h, comportamientos que confirman la plasticidad en los hábitos de picadura que han sido observados en América para esta especie (Voorham, 2002; Silva-Vasconcelos *et al.,* 2002). Se ha determinado que estos cambios en el comportamiento están relacionados con la región geográfica y la estación climática (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).

Durante el estudio realizado en Villavicencio, se registró un valor promedio de tasa de picadura de 16,8 hembras por persona por noche, con valores que oscilaron entre 4,2 y 56,7 hembras por persona por noche. La baja densidad, característica propia de esta especie (Charlwood, 1996), había sido observada por Brochero *et al*. (2005) en esta localidad. En América, la tasa de picadura de *An. darlingi* es variable con registros que van desde los 0,13 hasta 1.443 hembras por persona por noche (Rubio-Palis, 1995; Calderón *et al.,* 1995; Rozendaal, 1989; Vittor *et al*., 2006; Moreno *et al,* 2007; Magris *et al*., 2007; Hiwat *et al*., 2009). Sin embargo, Deane (1986) estableció que a pesar de las bajas densidades esta especie es capaz de mantener la transmisión de malaria como resultado de la alta susceptibilidad que tiene de infectarse con las diferentes especie de *Plasmodium.* Un aspecto relevante del análisis del comportamiento de picadura de las especies de *Anopheles* es establecer la relación con la actividad humana, a este respecto se determinó que *An. darlingi* está presente durante toda la noche dentro y fuera del domicilio humano sin mostrar diferencia en la actividad entre estos dos ambientes. A partir de este resultado se puede establecer que la población humana tiene el mismo riesgo de contacto con el mosquito en los dos lugares. El nivel de exposición a la picadura se ve incrementado porque las personas están activas entre las 18:00 y 22:00 h 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 observados para *An. darlingi* en cada uno de estos ambientes. Con respecto al periodo entre las 22:00 y las 4:00 h, se observa que el comportamiento del mosquito responde a la disponibilidad de alimento sanguíneo dado que hay un aumento en la proporción de mosquitos en el intradomicilio comparado con el peridomicilio.

Con relación a las variaciones en la población de *An. darlingi* a lo largo del año se observó que la tasa de picadura mensual, registrada en Villavicencio entre julio de 2008 y junio de 2008, exhibió un comportamiento bimodal con valores mayores en el mes de julio, tiempo que corresponde con la época de transición entre el periodo de lluvia y periodo seco, y en el mes de febrero que corresponde con la época seca. Patrones de fluctuación estacional similares al encontrado en Villavicencio han sido descritos para poblaciones de esta especie en América (Povoa *et al.,* 2001; Achee *et al.,* 2006; Moreno *et al*., 2007). Adicionalmente, en otros trabajos se hace referencia a patrones que establecen que las mayores densidades se presentan en los meses lluviosos y las menores en los meses más secos (Fernández *et al*, 1995; Rubio-Palis, 1995; Voorham, 2002; Tineo *et al*., 2003; Girod *et al*., 2008). Sin embargo, estudios de asociación entre la tasa de picadura y los niveles de precipitación han demostrado que no existe correlación entre estas dos variables (Magris *et* al., 2007; Moreno *et al*., 2007). Este tipo de observaciones evidencian la capacidad de adaptación de esta especie a las condiciones ambientales, donde factores como la precipitación, entre otros, pueden determinar su comportamiento a lo largo del año.

An. darlingi fue la única especie en la que se detectó infección con *P. falciparum* en el área de estudio. La tasa de infección para esta especie fue de 0.05%, similar a la encontrada en un estudio previo que incluyó mosquitos de este departamento, donde se determinó una tasa de infección con el mismo parásito de 0,07% (Herrera *et al.,* 1987). A partir del valor de infección se calculó para Villavicencio una TEI de 3,0 picaduras infectivas por persona por año. El valor estimado de TEI durante este estudio está dentro de los valores obtenidos en otras área de transmisión de malaria en América, 1,65 y 10 picaduras infectivas por persona por año en Brasil, 21,6 picaduras infectivas por persona por año en la Amazonía de Guyana Francesa y 129 picaduras infectivas por persona por

año en el sureste de Venezuela (Silva-Vasconcelos *et al*., 2002; Soares-Gil *et al*, 2003; Magris *et al*., 2007; Girod *et al*., 2008).

Al observar el comportamiento histórico de la malaria y particularmente la distribución de los casos en el 2008, periodo en el que se presentó un brote en Villavicencio, se estableció que el aumento de los casos en febrero y julio (Figura 4) se dio en los meses donde se observó un incremento en la tasa de picadura de *An. darlingi* (Figura 7). Adicionalmente, durante brote en Villavicencio se detectó la infección natural de esta especie con *P. falciparum,* confirwirthdo la importancia que tiene en la transmisión de malaria a pesar de las bajas tasas de picadura registradas.

El análisis de las secuencias de los marcadores moleculares, ITS2 y COI, permitió confirmar la presencia de *An. marajoara,* uno de los miembros de complejo *Albitarsis* en el departamento del Meta. Esta especie había sido registrada en este departamento como *An. albitarsis* s.l. o *An*. *allopha*, su distribución incluye 18 de los 29 municipios del departamento (Gast, 1943; Renjifo, 1948; Bates y Zulueta, 1949; SEM, 1957; Renjifo y Zulueta 1974; Faran, 1980; Brochero *et al*., 2005; González y Carrejo, 2007). Durante este estudio a pesar de haber recolectado *An. marajoara* en diferentes sitios de cría con abundancia similar a *An. darlingi*, el hallazgo poco frecuente en capturas con atrayente humano parece indicar una tendencia poco antropofílica en este departamento. Los estudios de preferencias alimentarias han establecido que esta especie se alimenta principalmente en ganado vacuno (Rubio-Palis *et al*., 1994), hábito que puede explicar el reducido número de mosquitos recolectados en las capturas con atrayente humano. Sin embargo, estudios realizados en Brasil y Venezuela han establecido que esta especie se recolecta con atrayente humano en igual o mayor proporción que *An. darlingi*, mostrando un mayor nivel de antropofilia (Conn *et al*., 2002; Moreno *et al.,* 2007).

Aunque en este estudio *An. marajoara* no se encontró infectada con *Plasmodium*, debido probablemente al número reducido de mosquitos evaluados, en América ha sido encontrada con parásitos de *Plasmodium* en Bolívar, Venezuela (Rubio-Palis *et al.,* 1992; Moreno *et al*., 2005), Meta, Colombia (Herrera *et al*., 1987), Rondonia (Oliveira-Ferreira *et al*., 1990) y Amapá, Brasil, siendo en este último lugar considerado vector primario de malaria (Conn *et al*., 2002). Esta especie exhibe en el área de estudio algunas características importantes en los hábitos de picadura que le permitirían actuar como vector, tiene un comportamiento exofágico y endofágico con actividad durante toda la noche al interior de la vivienda. Presenta una mayor 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. Está presente en los periodos de transición y secos cuando las poblaciones de *An. darlingi* pueden descender, época en la que se ha establecido tiene una mayor capacidad vectorial (Rubio-Palis *et al.,* 1994). Sin embargo, las bajas tasas de picadura y su comportamiento poco antropofílico, que reducirían su eficiencia en la transmisión de malaria, pueden cambiar como resultado de la capacidad que tiene de adaptarse a sitios de cría propios de ambientes transformados y a la posibilidad de utilizar al hombre como fuente alimento sanguíneo en lugares donde otras especies no pueden proliferar, comportamientos que ya fueron observados en localidades de Brasil donde esta especie actúa como vector primario de malaria (Conn *et al*., 2002; Moreno *et al.,* 2007).

Para el caso de las especies del complejo *Oswaldoi*, como resultado de la comparación de la secuencia del gen COI se logró confirmar la presencia de *An. oswaldoi* B en el municipio de Vista Hermosa. Bajo el nombre de *An. oswaldoi* s.l, esta especie se registra en 13 municipios del departamento (Gast, 1943; SEM, 1957; Faran, 1980; González y Carrejo, 2007). En Colombia *An. oswaldoi* B está incriminada como vector de *P. vivax* en el departamento de

Putumayo (Quiñones *et al.,* 2006; Ruiz F, Wilkerson RC, Ponsoby D, Quiñones ML, Sallum MA, Linton YM. Molecular systematics of the *Oswaldoi* Complex (*Anopheles: Nyssorhynchus*) in South America. Memorias 75 Annual Meeting of the American Mosquito Control Association, Nueva Orleans, EU, abril de 2009). Adicionalmente, *An. oswaldoi* s.l ha sido encontrada infectada con parásitos de *Plasmodium* en Venezuela (Rubio-Palis *et al.*,1992), Perú (Hayes *et al.,* 1987) y Brasil donde es considerada vector de malaria (Arruda *et al*., 1986; Branquinho *et al*.,1993, 1996; Marrelli *et al*., 1998; Marrelli *et al*., 1999; Povoa *et al*., 2001). Hasta el momento en este estudio no se han procesado los mosquitos de esta especie para la detección de *Plasmodium.*

Durante el estudio de sitios de cría realizado en Vista Hermosa se observó que *An. oswaldoi* B fue la especie más abundante comparada principalmente con *An. darlingi*, sin embargo en las capturas con atrayente humano su abundancia fue similar, debido probablemente al comportamiento zoofílico observado para esta especie en América, hábito que le permite buscar alternativas diferentes al hombre como fuente de alimento sanguíneo (Deane *et al*., 1948; Lourenco de Oliveira *et al.,* 1989). Los índices de sangre humana e índices de alimentación obtenidos en Venezuela confirman que esta especie incluye al hombre dentro de sus fuentes de alimento (Rubio-Palis *et al*., 1994).

En Vista Hermosa *An. oswaldoi* B presenta un comportamiento crepuscular, principalmente exofágico aunque ocasionalmente ingresa en la vivienda, donde registra mayor actividad hacia la media noche, patrón de actividad que es similar al descrito para esta especie en otros países de América (Deane *et al*., 1948; Elliott, 1967; Lourenco de Oliveira *et al.,* 1989; Rubio-Palis y Curtis, 1992; Rubio-Palis *et al*., 1994).

La presencia de *An. darlingi* y *An. oswaldoi* B en el municipio de Vista Hermosa, área históricamente considerada de alto riesgo de transmisión de malaria,

puede ser la causa del elevado número de casos al actuar ambas especies como vectores. Sin embargo, es necesario realizar estudios detallados de comportamiento e infección natural que permitan establecer el papel que cada una de ellas tiene en el mantenimiento de la transmisión en esta zona del departamento.

An. rangeli está ampliamente distribuida en el departamento, hasta el momento había sido registrada en 16 municipios (Gast, 1943; SEM, 1957; Renjifo y Zulueta 1974; Faran, 1980; Brochero *et al*., 2005; González y Carrejo, 2007), este trabajo permitió ampliar su distribución al municipio de Puerto Concordia. Esta especie fue recolectada en sitios de cría en cinco de los municipios de estudio, sin embargo en las capturas con atrayente humano solo se capturó en Villavicencio donde la intensidad de muestreo fue mayor y donde esta especie ya había sido recolectada atraída por humanos (Brochero *et al*., 2005). Por el comportamiento observado para *An. rangeli* se puede establecer que la población de este departamento es poco antropofílica comparada con las poblaciones de Putumayo y Cimitarra en Colombia y las de Venezuela donde el valor del índice de sangre humana se estimó entre 30% y 40% (Quiñones ML, Linton YM, Harbach RE, Estrada DA, Erazo HF, Calle DA, Ruíz JF. Malaria Vector Species in Southern Colombia: Species determination and natural infectivity. Abstracts XV International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Cartagena de Indias, Colombia, agosto de 2000; Brochero *et al.*, 2006; Rubio-Palis *et al*., 1994).

A pesar de su comportamiento poco antropofílico, se pudo establecer que *An. rangeli* es una especie con hábito de picadura principalmente exofágico, aunque también ingresa a la vivienda. La actividad hematofágica estuvo restringida a las tres primeras horas de la noche, tiempo que coincide con el periodo de mayor exposición de la población a la picadura fuera y dentro de la vivienda. Se observó que está presente en las épocas de transición entre el periodo de lluvia

y el periodo seco. Aunque durante este estudio *An. rangeli* no se encontró infectada con *Plasmodium*, debido probablemente al poco número mosquitos examinados, el análisis de las secuencias de ITS2 mostró un porcentaje de homología del 99% con las obtenidas a partir de especímenes del Putumayo donde esta especie está incriminada como vector de malaria (Quiñones *et al*., 2006). Este resultado pone en evidencia que esta especie es susceptible de infectarse con especies de *Plasmodium,* condición que también ha sido observada en poblaciones de Perú (Hayes *et al*., 1987) y Brasil (Povoa *et al.*, 2001). A pesar de lo anterior, el comportamiento poco antropofílico observado para *An. rangeli* puede ser un impedimento para que esta especie actúe como un vector eficiente de malaria en este departamento.

An. neomaculipalpus es una especie con una amplia distribución en América (Knight y Stone, 1977). A partir de este trabajo se incluyó el municipio de Vista Hermosa a la distribución que hasta el momento se tenía de esta especie en el departamento del Meta (Renjifo y Zulueta, 1974; González y Carrejo, 2007). Se recolectó un único individuo con atrayente humano hallazgo que evidencia que esta especie incluye al hombre como fuente para la ingesta de sangre, resultado que coincide con lo observado por Rubio-Palis *et al*., (1994) en Venezuela, donde el índice de sangre humana fue de 50%. Ha sido encontrada infectada con *P. falciparum* en Casanare, Colombia (Herrera *et al*., 1987) y en Bolívar, Venezuela por *P. vivax* mostrando en esta última localidad una infección similar a la establecida para *An*. *darlingi* (Moreno *et al*., 2005), sin embargo en Colombia, a excepción del hallazgo de infección no se tiene conocimiento de su importancia como vector de malaria.

Para *An. costai*, en el análisis de las secuencias de ITS2 se obtuvo un 98% de homología con *An. mediopunctatus* de Amapá, Brasil. Dado este resultado y ante la evidencia de que bajo este nombre se incluyen tres especies, *An. mediopunctatus* s.s., restringida al sureste de Brasil, *An. costai* y *An. forattinii*

(Sallum *et al*.,1999; Wilkerson y Sallum, 1999), se utilizaron los caracteres morfológicos diagnósticos de la pupa y la genitalia del macho para realizar la identificación taxonómica de esta especie, identidad que fue confirmada por la Dra. Maria Anice Sallum, especialista en este grupo. Este hallazgo permitió ampliar la distribución de *An. costai* a los municipios de Fuente de Oro y Puerto Concordia dado que solo había sido confirmada para Restrepo (Sallum *et al.,* 1999).

Se tiene poca información acerca de la biología e importancia como vector de malaria de esta especie debido a que en la mayoría de los casos ha sido identificada como *An. mediopunctatus* s.l. El comportamiento registrado en este estudio para *An. costai* es similar al descrito anteriormente para *An. mediopunctatus* s.l dado que las larvas de esta han sido encontradas en ambientes naturales y sombreados y los adultos, en Colombia, presentan un comportamiento antropofílico y con tendencia a la domiciliación (Ferrer, 1956; Forattini, 1962). Esto último, se observó particularmente en Villavicencio donde *An. costai* se capturó con atrayente humano únicamente en el peridomicilio entre las 18:00 y 19:00 h, resultado que demuestra que esta especie puede alimentarse en humanos, accede al domicilio y que está presente cuando la población está expuesta a las picaduras. Estudios han demostrado que *An. mediopunctatus* s.l. es susceptible de infectarse con *P. falciparum* y *P. vivax* (Klein *et al.,* 1991a; 1991b), sin embargo hasta el momento existen pocas evidencias que incriminen particularmente a *An. costai* en la transmisión de malaria (Sallum *et al.,* 1999; Wilkerson y Sallum, 1999).

Del complejo de *Triannulatus* que incluye tres especies, la utilización de la secuencia de COI permitió confirmar la presencia de *An. triannulatus* s.s., la cual presenta una amplia distribución en América (Faran y Linthicum, 1981; Chadee y Wilkerson, 2005). Durante el estudio esta especie fue recolectada en sitios de cría y con atrayente humano en cinco de las seis áreas de estudio, sin

embargo a pesar de su amplia distribución fueron pocos los individuos capturados en cada una de ellas. La baja densidad en capturas con atrayente humano coincide con el comportamiento que había sido registrado para esta especie en este departamento (Renjifo y Zulueta, 1974). A pesar de los pocos individuos capturados se observa una tendencia similar en el comportamiento registrado para *An. triannulatus* s.l. en otras regiones de América, donde se establece que tiene hábitos exofágicos con actividad hematofágica toda la noche con un pico entre las 19:00 y 20:00 h (Rubio-Palis y Curtis, 1992; Oviedo y Scorza, 1993; Silva-do-Nascimento, 2007). Se ha registrado su infección con parásitos de *Plasmodium* en los estados de Amapá, Pará y Rondonia en Brasil (Deane, 1986, Lourenco de Oliveira *et al*., 1990; Povoa *et al*., 2001; Ribeiro-Galardo *et al*., 2007). Sin embargo en Colombia, esta especie no ha sido reportada infectada hasta el momento (Herrera *et al*., 1987; Gutiérrez *et al*., 2008). A pesar de la evidencias de infección con *Plasmodium* y de su hábito de toma de alimento sanguíneo en humano se desconoce su importancia como vector de malaria.

An. braziliensis es una especie que está presente al este de la cordillera de los Andes desde Venezuela hasta Sao Paulo en Brasil (Linthicum, 1988). Como resultado de este trabajo se amplió su distribución en el departamento del Meta al municipio de Puerto Concordia. Esta especie se capturó principalmente en criaderos naturales y aunque estuvo poco representada en las capturas con atrayente humano se observó que está activa en el intradomicilio y peridomicilio exhibiendo tres máximos de actividad, un comportamiento similar al observado en Brasil y Venezuela en donde exhibe diferentes patrones de actividad hematofágica (Deane *et al.,* 1948; Rubio-Palis, 2000, Silva-Vasconcelos *et al.,* 2002). Se estableció que esta especie se captura en el área de estudio durante la época seca y durante los periodos de transición. Sin embargo, aunque esta especie ha sido encontrada positiva para *P. falciparum* y *P. vivax* (Oliveira-Ferreira *et al.,* 1990; Povoa *et* al., 2001; Silva-Vasconcelos *et al.,* 2002) no se

tienen evidencias de su capacidad para transmitir los parásitos causantes de la malaria humana.

De las especies del complejo de *An. pseudopunctipennis* s.l., se tiene que el presente estudio permitió ampliar su distribución a los municipios de Granada y Fuente de Oro. Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado a cuál de las dos especies reconocidas del complejo corresponden los especímenes recolectados en el Meta (Estrada-Franco *et al*., 1993a, 1993b, 1993c Coetzee *et al*., 1999). *An. pseudopunctipennis* s.l. reconocida como uno de los principales vectores de malaria en América (Fleming, 1986; Elliott, 1969; Hayes *et al*., 1987; González-Cerón *et al.,* 1999) no ha sido encontrada infectada en Colombia, sin embargo por su importancia como vector en la región es considerada un vector secundario (Quiñones *et al*., 1987; Herrera *et al*., 1987; Olano *et al*., 2001, Gutiérrez *et al*., 2008). Durante este estudio se recolectó principalmente en estanques piscícolas pero no en las capturas con atrayente humano comportamiento que puede ser debido a su hábito de picadura poco antropofílico. Este comportamiento es variable a la largo de su rango de distribución como consecuencia de la capacidad que tiene de utilizar diferentes especies de mamíferos como fuentes de alimento sanguíneo (Sasse y Hackett, 1950; Fernández-Salas *et al.,* 1994; Lardeux *et al.,* 2007) y a la evidencia de la existencia de al menos dos especies dentro de este complejo, las cuales pueden exhibir hábitos de picadura diferentes.

An. argyritarsis es una especie con una amplia distribución en América, donde está reportada desde México hasta Argentina. En el Meta, a partir de este estudio se adiciona a la distribución de esta especie los municipios de Granada y Fuente de Oro. Durante el estudio los especímenes fueron recolectados en ambientes naturales y artificiales, sin embargo a pesar de la diversidad de sitios de cría, fueron pocos los individuos obtenidos, característica que había sido observada en Venezuela, donde las larvas de esta especie son poco

abundantes (Barrera *et al.,* 1998). Como ya ha sido documentado en algunos países de América, esta especie no es antropofílica (Rubio-Palis y Curtis, 1992; Berti *et al.,* 1998) comportamiento que fue observado en el área de estudio, donde no fue capturada con atrayente humano. Como resultado de estudios de comportamiento e incriminación vectorial Rubio-Palis (1993) establece que esta especie no es vector de los parásitos de malaria en América.

An. nimbus, especie capturada únicamente en sitios de cría, se encontró en principalmente en caños y lagunas, con 100% de sombra, localizados en un ambiente selvático. No se recolectó en las capturas con atrayente humano probablemente porque su actividad se ha registrado entre las 15:00 y 17:00 h (Gast, 1943). Se amplía la distribución de esta especie al municipio de Puerto Concordia, dado que hasta el momento solo había sido reportada en Restrepo y Villavicencio. No ha sido encontrada infectada con *Plasmodium* aunque es poco lo que se conoce acerca de la bionomía de esta especie.

7 Conclusiones

1. La utilización de caracteres morfológicos y el análisis la secuencia de nucleótidos del espaciador transcrito intergénico dos (ITS2) del ADN ribosomal y del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) permitió confirmar la presencia de 12 especies de género *Anopheles* en el departamento del Meta, *An. argyritarsis*, *An*. *braziliensis*, *An. costai, An. darlingi, An. neomaculipalpus*, *An. nimbus*, *An. peryassui*, *An. pseudopunctipennis* s.l, *An. rangeli* y particularmente aquellas que son miembros de complejos de especies como son *An. marajoara* (Complejo *Albitarsis*), *An. triannulatus* s.s (Complejo *Triannulatus*) y *An. oswaldoi* B (Complejo *Oswaldoi*) siendo las dos últimas los primeros registros para el departamento.

2. A pesar de la presencia de especies de *Anopheles* con antecedentes de infección o vectores reconocidos en otros países de América, solamente *An. darlingi* se encontró infectado con *Plasmodium falciparum*, presentó una amplia distribución y exhibió características en su comportamiento que confirman su papel como vector principal de malaria en el departamento de Meta.

3. En el departamento del Meta producto de las actividades humanas, no solo existen sitios de cría naturales sino que han sido construidos otros que poseen condiciones favorables para la cría no solo de *An. darlingi* sino de otras especies de *Anopheles.*

4. Durante este estudio se estableció que en el departamento del Meta están presentes junto con *An. darlingi* otras especies de *Anopheles* que incluyen al hombre como fuente de alimento sanguíneo, han mostrado

ser susceptibles de infectarse con las especies de *Plasmodium* causantes de la malaria en humanos, acceden al domicilio humano y están activas durante el tiempo en que la población está más expuesta a las picaduras, características que les permitirían actuar como vectores primarios o secundarios cuando las condiciones ambientales favorezcan su proliferación y haya un aumento de la tasa de infección.

8 Recomendaciones

Teniendo en cuenta los patrones de comportamiento de picadura observados para las especies de *Anopheles* y particularmente *An. darlingi* se puede implementar como medida de control para malaria el uso de mosquiteros tratados pero complementado con medidas de protección personal que reduzcan el contacto hombre-vector en la horas en que la población está más expuesta a las picaduras de los mosquitos.

Es necesario continuar con el estudio de las especies del género *Anopheles* presentes en el departamento del Meta dado que durante el desarrollo de este trabajo se identificó *An. oswaldoi* B, probable vector de malaria en el Putumayo, pero hasta ahora se desconoce su importancia como transmisor de las especies de *Plasmodium* en este departamento. Adicionalmente se confirmó la presencia de *An. marajoara*, especie incriminada en la transmisión de malaria en Brasil. Sin embargo, el reducido número de individuos capturados no permitió establecer su importancia como vector de malaria en este departamento.

9 Referencias bibliográficas

Acosta J, Llancari MJ. Trabajos entomológicos en focos actuales residuales de malaria. II-Estudios en el río Yavarí.1969.

Achee N, Grieco J, Rejmankova E, André R, Vanzie E, Polanco J, Briceño Ireneo, King R, Roberts D. Biting pattern and seasonal densities of Anopheles mosquitoes in the Cayo District, Belice, Central America with emphasis in *Anopheles darlingi*. J Vector Ecol. 2006; 31:45-57.

Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS,Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. Am J Trop Med Hyg. 1986;35:873-81.

Barrera R, Grillet ME, Rangel Y, Berti J, Achee A. Estudios ecoepidemiológicos de la reintroducción de la malaria en el nororiente de Venezuela mediante sistemas de información geográfica y sensores remotos. Bol Dir Malariol San Amb. 1998; 38:14-30.

Bates M, Zulueta J. The seasonal cycle of anopheline mosquitoes in a pond in Eastern Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1949; 29:129-50.

Berti J, Vanegas C, Amarista J, Gonzáles J, Montañez H, Castillo M, Guzmán H, Gonzáles J. Invesntario 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.

Branquinho MS, Lagos CB, Rocha RM, Natal D, Barata JM, Cochrane AH, Nardin E, Nussenzweig S, Kloetzel JK. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum, P. vivax,* the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993; 87:391-94.

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.

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; 21:182-86.

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

Brochero H, Li C, Wilkerson RC. A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76:1113-17.

Calderón G, Fernández R, Valle J. Especies de la fauna anophelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en Perú. Revista Peruana de Epidemiología. 1995; 8:5-23.

Coetzee M, Estrada-Franco JG, Wunderlich CA, Hunt RH. Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). Am J Trop Med Hyg. 1999; 60:649-53.

Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol Biol. 1996; 5:1-9.

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.

Chadee DD, Wilkerson RC. *Anopheles triannulatus* (Neiva and Pinto): A new *Anopheles* record from Trinidad, West Indies. J Am Mosq Control Assoc. 2005; 21:316-17.

Charlwood JD. Observation of the bionomics of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Brazil. Bull Entomol Res, 1980; 70:685-92.

Charlwood JD. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root . Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91:391-98.

Deane LM, Causey OR, Deane MP. Notas sobre a distribucao e a biologia dos anofelinos das regions Nordestina e Amazonica do Brasil. Braz Serv Espec Saúde Pública Rev. 1948; 827-965.

Deane LM. Malaria vector in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81:5-14.

De Zulueta J. Observations on mosquito density in an endemic malarious area in Eastern Colombia. Am J Trop Med Hyg 1950;1:314-29.

Elliott, R. The biting cycles of some anophelines mosquitos in Colombia. Bull World Health Organ. 1967; 62.600. p.25.

Elliott R. Ecology and behaviour of malaria vectors in the American region. Ent Med Parasitol. 1969; 1:29-33.

Elliott R. The influence of vector behaviour on malaria transmission. Am J Trop Med Hyg. 1972; 21:765-63.

Estrada-Franco JG, Lanzaro GC, Ma MC, Walker-Abbey A, Romans P, Galvan-Sanchez C, Céspedes JC, Vargas-Sagarnaga R, Laughinghouse **A, Columbus I, Gwadz RW.** Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato from three countries of neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. Am J Trop Med Hyg. 1993a; 49:735-45.

Estrada-Franco JG, Ma MC, Gwadz RW, Sakai R, Lanzaro GC, Laughinghouse A, Galván-Sánchez C, Cespedes JL, Vargas-Sagarnaga R. Evidence through cross-mating experiments of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato: a primary malaria vector of the American continent. Am J Trop Med Hyg. 1993b; 49:746-55.

Estrada-Franco JG, Ma MC, Lanzaro GC, Gwadz RW, Galvan-Sanchez C, Cespedes JL, Vargas-Sagarnaga R, Rodríguez R. Genetic evidence of Species Complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato. Bull Pan Am Health Organ. 1993c; 27:26-31

Faran ME. A revisión of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus*. Contrib Am Entomol Inst. 1980; 15:1-215.

Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1981; 13:1-81.

Fernández LR, Carbajal F, Quintana ZJ, Chauca H, Watts DM. Presencia de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) en los alrededores de la ciudad de Iquitos, Loreto, Perú. Soc Per Enf Infec Trop.1995; 5: 10-2.

Fernández-Salas I, Rodríguez MH, Roberts DR, Rodríguez C, Wirth RA. Bionomics of adult *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) in the Tapachula foothills area of southern of Mexico. J Med Entomol. 1994; 31:663-70.

Ferrer FH, Vectores de Malaria en Colombia. Curso de Entomología Médica, Fac Hig. Saludé Publica. Univ. Sao Paulo, Brasil, 1956.

Fleming G. Biology and ecology of malaria vectors in the Americas. Washington, DC: Pan American Health Organization, 1986, PNSP/86-72.

Forattini OP. Entomología Médica, Volumen 1. Facultad de Higiene e Saude Publica, Departamento de Parasitología, Sal Paulo; 1962. p. 335.

Forattini OP. Comportamento exofilo de *Anopheles darlingi* Root, em regiao meridional do Brasil. Rev. Saúde Públ 1987; 21:291-304.

Gast A. Biología y distribución geográfica de los anophelinos de Colombia. Rev Fac Med. 1943; 12:5-55.

Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly, Fouque F. *Anopheles darlingi* bionomics and transmision of *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax* and *Plas*modium malariae in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazomian forest, French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103:702-10.

González R, Carrejo N. Introducción al estudio taxonómica de *Anopheles* de Colombia claves taxonómicas y notas de distribución. Universidad del Valle; 2007. 237pp.

González-Cerón M, Rodríguez MH, Nettel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernández JE. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to Infections with Coindigenous *Plasmodium vivax* Variants VK210 and VK247 in Southern Mexico. Infect and Immun.1999; 67:410-12.

Grieco JP, Achee NL, Roberts DR. Andre RG. Comparative susceptibility of three species of *Anopheles* from Belize, Central America, to *Plasmodium falciparum* (nf-54). J Am Mosq Control Assoc. 2005; 21:279-90.

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 Tropica. 2008; 107:99-105.

Harris AF, Matias-Arnéz A, Hill N. Biting time of *Anopheles darlingi* in the Bolivian Amazon and implications for control of malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006; 100:45-7.

Hayes J, Calderon G, Falcon R, Zambrano V. Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Perú. J Am Mosq Control Assoc. 1987; 3:418-22.

Herrera S, Suárez M, Sánchez G, Quiñones ML, Herrera M. Uso de la técnica inmunoradiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoitos de *Plasmodium*. Colombia Médica 1987; 18:2-6.

Hiwat H, Issaly J, Gaborit P, Somai A, Samjhawan A, Sardjoe P, Soekhoe T, Girod R. Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009. Septiembre (Publicación anticipada).

IGAC, Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Diccionario Geográfico de Colombia. Tercera edición, Colombia. 1986. p.1364-65.

Klein TA, Lima J. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes on Costa Marques, Rondonia, Brazil, J Am Mosq Control Assoc. 1990; 6:700-7.

Klein TA, Lima J, Tada MS. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1991a; 44:598-603.

Klein TA, Lima J, Tada MS, Miller R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax.* Am J Trop Med Hyg. 1991b; 44: 463-70.

Kreutzer RD, Kitzmiller JB, Rabbani MG. Cytogenetically distinguishable sympatric and allopatric populations of the mosquitos *Anopheles albitarsis*. Acta Amaz. 1976; 6:473-81.

Krzywinski J, Besansky NJ. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. Annu Rev Entomol. 2003; 48:111-39.

Knight KL, Stone A. A catalog of Mosquitoes of the World. Diptera: Culicidae. 1977. Entomological Society of America, Thomas Say Foundation, Baltimore, USA. p. 610.

Lardeux F. Loayza P, Bouchité B, Chavez T. Host choice and human blood index of *Anopheles pseudopunctipennis* in a village of the Andean valleys of Bolivia. Malar J. 2007; 6:8.

Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE. Cryptic species in *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae): incongruence between random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequence. Ann Entomol Soc Amer. 2005; 98: 908-17.

León W, Valle J, Naupay R, Tineo E, Rosas A, Palomino M. Comportamiento Estacional de *Anophles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926 en localidades de Loreto Y Madre de Dios, Perú 1999-2000. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2003; 20:22-7.

Li C, Wilkerson RC. 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; 100:495-500.

Linthicum KJ. A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera:Culicidae). Mosq Sys 1988; 20:98-271.

Lounibos P, Conn J. Malaria vector heterogeneity in South America. Am Entomologist. 2000; 46:238-49.

Lourenco de Oliveira R, Guimarães AE, Arle M, Castro MG, Motto MA, Deane LM. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84:501-14.

Lourenco de Oliveira R, Teva A, Deane LM Daniel CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 1990; 43:6-10.

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.

Marrelli MT, Branquinho MS, Hoffmann HE, Taipe-Lagos CB, Natal D., Kloetzel JK. Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax* like / *Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline population in the state of Acre, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92:149-51.

Marrelli MT, Honorio NA, Flores-Mendoza C, Lourenço de Oliveira R, Marinotti O, Kloetzel JK. Comparative susceptibility of two members of the *Anopheles oswaldoi* complex*, An. oswaldoi* and *An. konderi,* to infection by *Plasmodium vivax.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999; 93:381-84.

Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Lourenço-de-Oliveira R, Flores-Mendoza C, Mariotti O. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. Med Vet Entomol. 2005; 19:208-18.

Marrelli MT, Sallum MA, Marinotti O. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy - A critical review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101:817-32.

Moreno JE, Rubio-Palis Y, Páez E, Pérez A, Sánches V, Vaccari E. *Anopheles* (*Anopheles*) *neomaculipalpus*: a new malaria vector in the Amazon basin? Med Vet Entomol. 2005; 19:329-32.

Moreno JE, Rubio-Palis Y, Páez E, Pérez E, Sánches 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.

Motoki MT, Linton YM, Ruiz F, Flores-Mendoza C, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles oswaldoi* (Peryassu, 1922) (Diptera: Culicidae), with formal lectotype designation. Zootaxa. 2007; 1588:31-51.

Motoki MT, Wilkerson RC, Sallum MAM. The *Anophles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconae* Wilkerson y Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). Mem Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104:823-50.

Olano V, Brochero H, Sáenz R, Quiñones M, Molina J. Mapas preliminares de la distribución de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica 2001; 21:402-403.

Oliveira-Ferreira J, Lourenco de Oliveira R, Teva A, Deane L, Danie-Ribeiro CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia state, Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1990; 43:6-10.

Orr BK, Resh VH. Experimental test of the influence of aquatic macrophyte cover on the survival of Anopheles larvae. J Am Mosq Contr Assoc 1989; 5: 581-85.

Oviedo M, Scorza JV. Predictive análisis of *Anopheles triannulatus* abundance in western Venezuela. J Am. Mosq Control Assoc. 1993; 9:443-44.

Padilla J, Peña S. Situación epidemiológica de la malaria en Colombia. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2002; 7:333-45.

Pinedo-Cancino V, Sheen P, Tarazona-Santos E, Oswald WD, Jeri C, Vittor AY, Patz JA, Gilman RH. Limited diversity of *Anopheles darlingi* in the peruvian amazon region of Iquitos. Am J Trp Med Hyg. 2006; 75:238-45.

Povoa MM, Wirtz RA, Lacerda R, Miles MA, Warhurst D. Malaria Vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96:179-84.

Quiñones M, Suárez M, Fleming F. Distribución y bionomía de los anofelinos de la costa Pacífica colombiana. Colombia Médica. 1987; 18:19-24.

Quiñones ML, Ruiz F, Erazo H, Calle D, Linton YM. Natural infectivity of *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* and *An. (N.) rangeli* by ELISA for *Plasmodium vivax* in southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101:617-623.

Renjifo S. Disecciones de mosquitos del género *Anopheles* en la Intendencia del Meta. Caldasia. 1948; 5:99-103.

Renjifo S, Zulueta J. Five years observations of rural malaria in Eastern Colombia. Cespedecia. 1974; 9 -12:305-22.

Ribeiro-Galardo A, Arruda M, D'Almeida A, Wirtz R, Lounibos LP, Zimmerman RH. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the brazilian amazon. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76:461-69.

Rosa-Freitas MG, Lourenço de Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Fernandes T, Silva DM. Anopheline species complexes in Brazil. current knowledge of those related to malaria transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93:651-655.

Rozendaal JA. Biting and resting of *Anophleles darling* in the Surinam rainforest. J Am Mosq Control Assoc. 1989; 5:351-8.

Rubio-Palis Y, Curtis CF. Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. Med Vet Entomol. 1992, 6: 325-34.

Rubio-Palis Y, Wirtz RA, Curtis CF. Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. Acta Trop. 1992; 52: 167-74.

Rubio-Palis Y. Is *Anophles argyritarsis* a vector of malaria in the neotropical region? J Am Mosq Control Assoc. 1993; 9:470-71.

Rubio-Palis Y, Curtis CF, González C. Wirtz RA. Host choice of anopheline mosquitoes in a malaria endemic area of western Venezuela. Med Vet Entomol. 1994; 8, 275-80.

Rubio-Palis Y. Observaciones sobre el patrón de actividad hematofágica del vector de la malaria *Anopheles darlingi* en las poblaciones del sur de Venezuela. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. 1995; 35: 66-70.

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.

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.

Sallum MA, Wilkerson RC, Forattini OP. Taxonomic study of species formerly identified as *Anopheles mediopunctatus* and resurrection of *An. costai* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1999; 36:282-300.

Sallum MA, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Dos Santos CLS. Insight into *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae) Species from Brazil. J Med Entomol. 2008; 45:970-81.

Sasse BE, Hackett LW. Note on the host preferences of *Anopheles pseudopunctipennis*. J Natl Malar Soc 1950; 9: 181-82.

SEM, Servicio de erradicación de la malaria. Plan de erradicación de la malaria en Colombia. Volumen I y II, Ministerio de Salud Nacional. Bogotá. 1957.

Service MW, Townson H. The anopheles vector. En: Warrell DA, Gilles HM, editor. Essencial malariology. Cuarta Edición. Oxford University Press; 2002. p. 59.

Silva-do-Nascimento T, Lourenço-de-Oliveira R . *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97:1-11.

Silva-do-Nascimento T, Wilkerson RC, Lourenço-de-Oliveira R, Monteiro FA. Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in Central Brazil. J Med Entomol. 2006; 43:455-59.

Silva-do-Nascimento T, Lourenço-de-Oliveira R. Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the *Triannulatus* Complex (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 975-82.

Silva-Vasconcelos A, Kató MY, Mourão EN, de Souza RT, Lacerda RN, Sibajev A, Tsouris P, Povoa M, Momen H, Rosa-Freitas M. 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; 97:151-61.

Singer B, De Castro MC. Enhancement and suppression of malaria in the Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2006; 74:1-2.

SIVIGILA; Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, 2009.

Soares-Gil LH, Alves FR, Zieler H, Salcedo J, Durlacher R, Cunha R, Tada MS, Camargo L, Camargo E, Pereida-da-Silva LH. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. J Med Entomo. 2003; 140: 636-41.

Tadei W, Dutary-Thatcher B, Santos J, Scarpassa V, Rodriguez I, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. J Am Trop Med. 1998; 59: 325-35.

Tineo E, Medina A, Fallaque C, Chávez L, Quispe S, Mercado M, Zevallos J, León W, Palomino M. Distribución geográfica y comportamiento estacional de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926, en localidades de la frontera Perú-Bolivia, Madre de Dios, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2003: 20:78-83.

Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi,* the primary vector of *P. falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2006; 74:3-11.

World Health Organization. World Malaria Reports. World Health Organization Press, 2008; p. 190.

Wilkerson RC, Parsons TJ, Albright DG, Klein TA, Braun MJ. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). Insect Mol Biol.1993; 1:205-211.

Wilkerson RC, Gaffigan T, Lima JB. Identification of species related to *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995a; 90:721-732.

Wilkerson RC, Parsons 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.1995b; 32:697-704.

Wilkerson RC, Sallum MA. *Anopheles (Anopheles) forattinii*: a new species in Series Arribalzagia (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1999; 36:345-54.

Wilkerson RC, Foster PG, Li C, Sallum MAM. Molecular phylogeny of the Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) Albitarsis* species complex (Diptera: Culicidae). Ann Entomol Soc Amer. 2005; 98:918-25.

Wirtz R, Burkot T, Andre RG, Rosenberg R, Collins WE, Roberts DR. Identification of *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes using an enzyme linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 1895; 54:1048-54.

Wirtz R, Burkot T, Graves T, Andre RG. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoe (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. J Med Entomol 1987; 24:433-37.

Wirtz R, Avery M, Benedict M. Plasmodium Sporozoite ELISA. En Specific *Anopheles* Techniques. Centers for Disease Control and Prevention. (Consultado: Enero 20 de 2009). Disponible en URL:http://www2.ncid.cdc.gov/vector/TrainingManualPDFs/3.3%20Plasmodium%20Sporozoite%20ELISA%20v%201.pdf.

Voorham J. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapa, Brazil. Rev. Saude Publ 2002; 36:75-80.

Zambrano P. Informe final de malaria, semanas 1 a 52 Colombia 2005. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2006; 11:49-53.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol. 2000; 7:203-14.

Zimmerman R. Ecology of malaria vector in the Americas and future direction. Inst Oswaldo Cruz. 1992; 87:371-83.

Anexo 1. Formato para descripción de criaderos

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Proyecto: Determinación del papel como vectores de malaria de las especies de Anopheles en tres regiones de Colombia
Universidad Nacional de Colombia, Instituto Nacional de Salud, Secretaría de Salud del Meta, Colciencias

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Formulario 3. Descripción del criadero

1. Localización del criadero

Fecha: ☐☐☐ **Número del criadero:** ☐☐☐
día mes año **Dpto Mun No. criadero**

Sitio: _____ **Vereda:** _____

Municipio: _____ **Departamento:** _____

Altitud: _____ **LN:** _____ **LO:** _____

Urbana ☐ **Periurbana** ☐ **Rural** ☐

Conoce casos de malaria en el año 2008 en viviendas cercanas al criadero **Si** ☐ **No** ☐

Distancia de la (s) vivenda (s) mas cercanas al criadero (m) _____ **m**

2. Descripción del criadero

Tamaño del criadero (metros): ☐ **X** ☐
Largo Ancho

Porcentaje de sombra en el criadero: ☐ **%**

Tipo de vegetación:

Circundante ☐ **Emergente** ☐ **Flotante** ☐ **Sin vegetación** ☐

Tipo de Agua:

Estancada ☐

Corriente ☐ **Lenta** ☐ **Fuerte** ☐

Clara ☐ **Turbia** ☐

Temporal ☐ **Permanente** ☐

Factores fisico-químicos

Temperatura: _____ **pH:** _____

3. Informacion de la recoleccion (Realizar 1 cucharonada x metro cuadrado)

Nº de aproximado de larvas recolectadas ☐

Nº aproximado de cucharonadas realizadas ☐

4. Descripcion del criadero (Describa el criadero e indique el tipo de criadero)

5. Haga un esquema del criadero teniendo en cuenta su entorno y las viviendas

6. Observaciones:

Formato diligenciado por: _____

Nota: en caso de encontrar el criadero negativo diligencie el formulario

Anexo2. Formato para registro de actividad de picadura

[redacted]

Proyecto: Determinación del papel como vec
de las especies de Anopheles en tres regior
Universidad Nacional de Colombia, Instituto Na
Secretaría de Salud del Meta, Colciencias

Formulario 1. Actividad de picadura

1. Localización de la vivienda

Departamento: _____ **Municipio:** _____ **Corregimiento:** _____

Vereda: _____ **Barrio:** _____ **Finca:** _____

Latitud (grados): _____ **Longitud (grados):** _____ **Altura (msnm):** _____

Código de la vivienda _____ **Urbana** **Periurbana** **Rural**

2. Datos de la captura: **Tipo de trampa:** **Atrayente humano** **CDC** **Otro**

Fecha	Hora	Intradomicilio			Peridomicilio			T (ºC)		Humedad relativa	Lluvia min/50	Fase luna	Observaciones: Anotar en nombre de los recolectores
		Número Cebos	Código muestra	No. Mosquitos	NúmeroCebos	Codigo muestra	No. Mosquitos	Max.	Min.				
	18:00-19:00												
	19:00-20:00												
	20:00-21:00												
	21:00-22:00												
	22:00-23:00												
	23:00-24:00												
	24:00-1:00												
	01:00-02:00												
	02:00-03:00												
	03:00-04:00												
	04:00-05:00												
	05:00-06:00												