

DETERMINACIÓN DE *Anopheles sp* POR CLAVES MORFOLÓGICAS EN LOS
MUNICIPIOS DE SAN ONOFRE Y MORROA (SUCRE)

BLAS ABERTO PEREZ QUIROZ

GLADYS TERESA PEREZ RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2005

**DETERMINACIÓN DE *Anopheles sp* POR CLAVES MORFOLÓGICAS EN LOS
MUNICIPIOS DE SAN ONOFRE Y MORROA (SUCRE)**

**BLAS ALBERTO PEREZ QUIROZ
GLADYS TERESA PÉREZ RODRIGUEZ**

**Trabajo como requisito para optar al título de Biólogo con énfasis en
Biotecnología**

**Directores
PEDRO BLANCO
Medico MD-Metromed
DARY LUZ MENDOZA
QF. MsC Bioquímica**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2005**

Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo. Artículo 12 Resolución 02 – 03.

HOJA ACEPTACIÓN

Firma del primer Jurado

Firma del segundo Jurado

Firma del Decano

Firma del tercer Jurado

Firma del Director

Firma del presidente del jurado

Nota de aceptación

Sincelejo, 15 de Julio 2005

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fortaleza, a mis padres por darme la vida y por estar siempre conmigo, a mis hermanos por su amor fraterno e incondicional y a mi abuelita por creer siempre en mí.

Gladys Pérez Rodríguez

DEDICATORIA

A mi hija Natalia, a mi mujer Amira y
a mi madre, por ser las personas
más importantes para mí.

Blas Alberto Pérez Quiroz

AGRADECIMIENTOS

Gracias primero que todo a Dios por llenarme de sabiduría para llevar a cabo este proyecto, a mi familia, por el apoyo brindado, la paciencia y el amor que siempre tuvieron. A la Universidad de Sucre por la formación recibida, a mi compañero Blas por permitirme compartir con él este trabajo, a mis directores por su dedicación y consejos, a mis amigos de la universidad en especial a Claudia, Tania, Katia, Shirley, Marisella, Carmen, Rosana, Alveiro.

Gracias a las personas del PECET por la capacitación brindada en entomología medica, a la señora Mercedes Blanco, al señor Taurino Silgado y Sulgey Cochero por su colaboración constante y a todas aquellas personas que de una u otra manera nos apoyaron.

Gladys Pérez Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mi hija Natalia por servirme de inspiración y de motor en un momento crucial de mi vida, a mi madre por darme la vida y aunque nunca se lo he dicho eres responsable de todo lo bueno que tengo, Amira que es la persona más incondicional que he conocido, Gladys parte importante de de ocho años de mi vida en los cuales fue mi amiga y apoyo, al profesor Pedro y la seño Dary por su paciencia y comprensión, a Sulgey, Katia, shirley, Alveiro, Carmen, Rosana, gloria, Marisella, Edilsa, Livardo, Hainy y todos los demás amigos de Unisucré.

Blas Alberto Pérez Quiroz.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. EPIDEMIOLOGÍA	5
1.2. PATOLOGÍA Y SINTOMATOLOGÍA	6
1.3. EL VECTOR <i>Anopheles sp</i>	7
1.3.1 Ecología del vector	8
1.3.1.1 Criaderos	8
1.3.1.2 Ciclo de vida de <i>Anopheles sp</i>	9
1.4. TAXONOMÍA	11
1.5. MORFOLOGÍA	12
1.5.1 Cabeza	13
1.5.2 Tórax	13
1.5.3 Patas	13
1.5.4 Alas	14
1.5.5 Abdomen	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA de las especie de <i>Anopheles sp</i>	16
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. METODOLOGÍA	21
4.1. FASE DE CAMPO	21
4.2 FASE DE LABORATORIO	21
4.2.1 Identificación morfológica	21
4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
4.2.3 Restricción enzimática	22

4.2.4 Análisis de los productos de PCR	23
5. RESULTADOS	24
5.1 ÁREA DE ESTUDIO	24
5.2 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA	28
5.3 ANÁLISIS MOLECULAR DE <i>Anopheles sp</i>	35
5.3.1 Ensayo de PCR	35
6. DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morbilidad de Malaria en Colombia en los años 1998-2003	1
Figura 2. Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i>	4
Figura 3. Mapa de las zonas con transmisión de malaria en el Mundo.	5
Figura 4. <i>Anopheles</i> hembra alimentándose	7
Figura 5. Etapas del desarrollo del mosquito <i>Anopheles</i>	11
Figura 6. Ala de <i>Anopheles</i> del subgénero <i>Nyssorhynchus</i>	14
Figura 7. Mosquito <i>Anopheles</i> hembra vista lateral	15

LISTA DE GRAFICOS

	Pág.
Grafico 1. Relación de casos de malaria registrados por DASSALUD en el departamento de Sucre año 1996 – 2004.	6
Gráfico 2. Relación de captura de especímenes por meses de muestreo.	25
Gráfico 3. Porcentaje de especies recolectadas durante el periodo de muestreo.	26

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Especies de <i>Anopheles</i> capturados en los municipios de Morroa y San Onofre en el año 2003	27
Tabla 2. Valores medios y rangos de las medidas de <i>Anopheles</i> .	27

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	Pag.
Fotografía 1. Cabeza de <i>Anopheles albimanus</i> en el cual se detalla el color oscuro del cuarto palpómero, característico de esta especie	28
Fotografía 2. Relación de la longitud de la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero.	28
Fotografía 3. <i>Anopheles nuneztovari</i> . Relación de la longitud de la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero.	29
Fotografía 4. Detalles del ala de <i>A. Nuneztovari</i> .	29
Fotografía 5. <i>Anopheles triannulatus</i> . Penacho de escamas caudolaterales presentes en el segundo segmento abdominal.	30
Fotografía 6. <i>A. triannulatus</i> . Penacho de escamas claras en el mesanepimero.	31
Fotografía 7. <i>A. triannulatus</i> . Relación de la longitud la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero.	31
Fotografía 8. <i>A. triannulatus</i> . Relación de la medida de mancha clara humeral/basal oscura y de la subcostal clara/subcostal oscura	32

Fotografía 9. Pata posterior de <i>Ancpheies marajoara</i> .	32
Fotografía 10. Relación de la mancha clara humeral / oscura basal de <i>Ancpheies marajoara</i> .	33
Fotografía 11. Muestra los tarsómeros 1-5 oscuros característicos de <i>A. pseudopunctipennis</i> .	33
Fotografía 12. Detalles del ala de <i>A. pseudopunctipennis</i> . En la cual se observan solo dos manchas en la vena costa.	34
Fotografía 13. <i>A. aquasalis</i> . Penacho de escamas Presentes en el segundo segmento abdominal.	34
Fotografía 14. <i>A. aquasalis</i> . Relación de la medida de la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero.	35
Fotografía 15. <i>A. aquasalis</i> . Muestra la relación de la mancha oscura basal / mancha clara humeral y subcostal oscura / subcostal clara.	35
Fotografía 16. visualización de los productos de pcr y restricción enzimática de ITS2 de <i>Ancpheies nuneztovari</i> .	37

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo A. Mapa del Departamento de Sucre	50
Anexo B. Secuencia ITS2 de <i>A. nuneztovari</i> (locus ANU 92343) con enzimas de restricción.	51
Anexo C. Secuencia ITS2 de <i>A. aquasalis</i> con enzimas de restricción.	52
Anexo D. Secuencia completa ITS2 de <i>A. nuneztovari</i> (locus ANU 92351)	53
Anexo E. Secuencia completa ITS2 de <i>A. nuneztovari</i> (locus ANU 92343)	54
Anexo F. Secuencia completa ITS2 de <i>A. nuneztovari</i> (locus ANU 92350)	55

RESUMEN

El departamento de Sucre presenta tres subregiones, las cuales por sus condiciones bioclimáticas favorecen el desarrollo de mosquitos de importancia médica, como *Aedes* y *Anopheles* sp. El conocimiento de las especies existente en estas regiones es escaso, y existe una alta transmisión de la enfermedad en los departamentos vecinos a Sucre, como son Córdoba y Antioquia desde donde provienen la mayoría de casos importados de malaria, de allí la importancia de nuestro trabajo que consistió en determinar las especies de *Anopheles* presentes, en dos de las subregiones, Golfo Morrosquillo y Sabanas, en donde se efectuaron muestreos sistemáticos por siete meses, recolectando mosquitos hembras con el método de cebo humano.

En total se analizaron 221 especímenes adultos, empleando las claves de Faran (1980) y Faran y Linthicum (1981). Como resultado de esta investigación se sugiere la presencia de seis especies de *Anopheles*, dos de ellas catalogadas como vectores primarios para la malaria, *A. (N) albimanus* y *A. (N) nuneztovari*, y uno como vector secundario *A. (A) pseudopunctipennis*.

Ejemplares inicialmente identificados como *A. (N) aquasalis*, fueron luego clasificados como *A. (N) nuneztovari*, lo cual plantea la necesidad de continuar los estudios basados en pruebas moleculares, iniciados en esta investigación, pero que no proporcionaron los resultados de identificación de especies esperados.

ABSTRACT

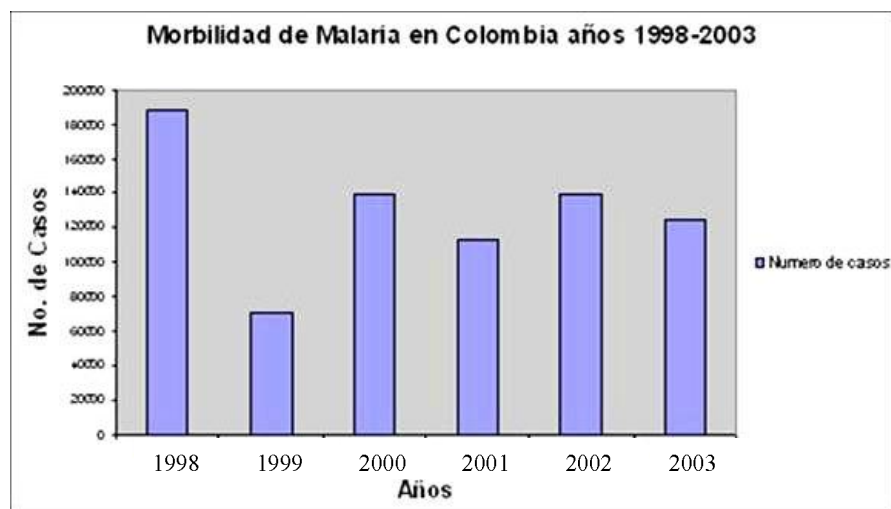
The department of Sucre presents three different subregions with bioclimatical conditions for the development of mosquitoes of medical importance, like *Aedes* and *Anopheles* sp. The knowledge of species present in these regions is scarce, and there is a high transmission of disease in departments of Cordoba and Antioquia from where the majority of cases imported of malaria, therefore the importance this our work, which it was determine the species of *Anopheles* presents in two subregions of department. This study was carried out in Golfo of Morrosquillo and Sabanas, where it collecting samples during 7 months, were collected female mosquitoes using human bait. It was identified 221 specimens adults, using Faran and Linthicum's key. This results suggest the presence of 6 species of *Anopheles*, three of this species were described as primary vectors to malaria *A. (N) albimanus* y *A. (N) nuneztovari*, and one as secondary vector *A. (A) pseudopunctipennis*. Specimens initially identified as *A. (N) aquasalis* were classified later as *A. (N) nuneztovari*, this results illustrates the need to follow studies based in molecular tests, initiated here, but that it didn't give the expects results.

INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es una enfermedad tropical endémica y considerada como un problema de salud pública en Colombia. La malaria representa un grave problema de salud en el 85% del territorio rural colombiano situado por debajo de los 1600 metros sobre el nivel del mar con condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad, estimándose que entre 18 a 24 millones de personas se encuentran en riesgo de enfermar o morir por esta causa¹.

El total de casos reportados por el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud pública (SIVIGILA) en el período comprendido en los años de 1998 a 2003 (Figura 1) muestra un aumento considerable de los casos de malaria, en el año de 1998 la transmisión de la enfermedad se observó influenciada por el fenómeno del niño, alcanzando 188.379 casos; las infecciones por *Plasmodium vivax* fueron predominantes los siguientes cinco años según lo reportado por el SIVIGILA.^{2,3}

Figura 1. Morbilidad de Malaria en Colombia en los años 1998-2003



Fuente: http://www.ins.gov.co/epidemiologia/cce/vsp/2004/2004_sivigila_08.pdf

La infección es transmitida por mosquitos hembras del género *Anopheles* sp, para nuestro país, aparecen registradas 43 especies de las cuales siete son consideradas posibles transmisoras de *plasmocidium*.^{4, 5, 6}

El desconocimiento sobre los factores relacionados con las biomas del vector y del parásito, ha sido una de las principales causas para las fallas en el control de vectores; por lo tanto, la prevención del paludismo mediante el control de los mosquitos requiere un conocimiento exhaustivo de la ecología de cada una de las especies de *Anopheles* y conocimiento de las circunstancias locales⁶.

En el Departamento de Sucre, en los últimos años se ha incrementado el número de casos de malaria diagnosticados⁷. Probablemente esto pueda ser ocasionado por factores externos, entre los que se destacan factores climáticos, ecológicos, escasos conocimientos sobre vectores por parte de la comunidad y ausencia de estudios relacionados con malaria.

En este estudio se efectuó un inventario de la especies de *Anopheles* presentes en los municipios de San Onofre y Morroa, durante siete meses (febrero –agosto) del año 2003, los especímenes fueron capturados utilizando el método de cebo humano y clasificados mediante claves morfológicas de Faran (1980)⁵, estos municipios se escogieron por presentar características ecológicas diferentes y favorables para el desarrollo del vector; además, el municipio de San Onofre presentó el mayor número de casos reportados de malaria en el periodo comprendido entre los años 1996 - 2000, en el departamento, datos que fueron suministrados por el Departamento Administrativo de Salud (DASSALUD) Sucre⁷.

1. MARCO TEORICO

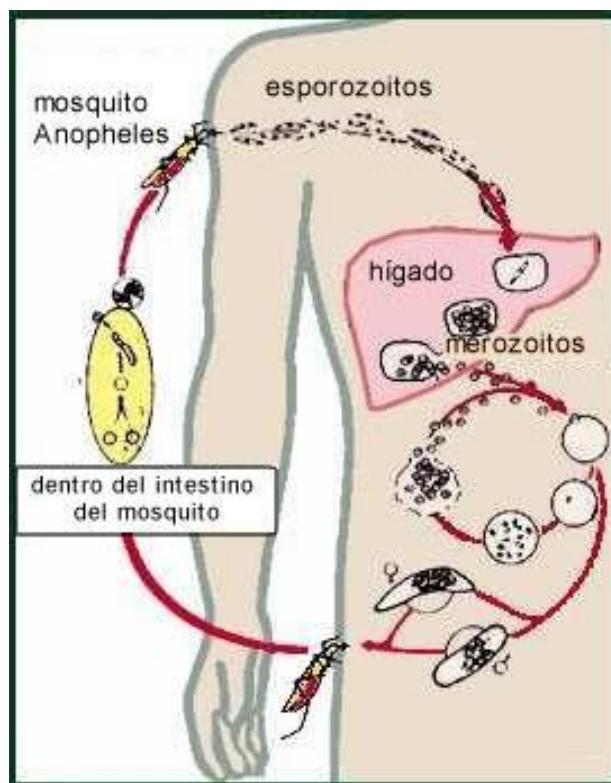
La malaria es una enfermedad parasitaria, causada por un parásito intracelular obligado del género *Plasmodium*, el cual es transmitido por mosquitos del género *Anopheles*. Cuatro especies del parásito causan malaria en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.⁸

De las cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre, *P. falciparum* es el más virulento y agresivo y ocasiona la mayoría de las muertes informadas; la infección por *P. vivax* es menos grave pero puede persistir por períodos muy largos y predomina en algunos lugares del mundo (en Colombia representa el 60 % de los casos y en Centro América y en México casi el 100% de los casos).⁸

Los parásitos del género *Plasmodium* parasitan una gran variedad de organismos incluyendo reptiles, aves, mamíferos donde ocurre la reproducción asexual y mosquitos del género *Anopheles* en el cual ocurre la reproducción sexual. Una vez la hembra *Anopheles* ha ingerido sangre con gametocitos maduros de ambos sexos, comienza el ciclo sexual; En la luz del intestino medio los gametocitos escapan de las células huésped y rápidamente sufren cambios preparatorios para la fertilización. El gametocito femenino (macrogametocito) extruye cuerpos de tipo polar, indicando que está asumiendo la condición haploide. El gametocito masculino (microgametocito), se exflagela para formar cuerpos de tipo esperma. La fertilización se produce cuando un microgameto entra en un macrogameto y se produce un cigoto móvil (ooquinetto); este, después de aproximadamente 24 horas atraviesa las células y enquistas en la pared externa del intestino medio, aquí se forma el ooquiste. El ooquiste se rompe y muchos esporozoitos viajan hasta las glándulas salivales^{1,8}.

El ciclo asexual en el hombre comienza por la inoculación de esporozoitos infecciosos por un *Anopheles* hembra; del torrente circulatorio pasa al hígado, aquí cambian a merozoítos (forma exoeritrocítica); estos van a la circulación para invadir los eritrocitos (ciclo intraeritrocítico) tomando inicialmente una forma anillada, denominada trofozoito, que al madurar adquiere una configuración irregular. Al dividir su cromatina se constituye el esquizonte que al madurar rompe el eritrocito liberando un número de merozoítos de acuerdo a la especie de *Plasmodium*; cada una de estas formas del parásito invade un nuevo eritrocito, repitiéndose nuevamente el ciclo eritrocítico. Algunos merozoítos al parecer, tienen una determinación genética para constituir los elementos masculinos y femeninos es decir los gametocitos, que circulan como formas infectantes para los mosquitos y no producen sintomatología en el hombre.^{1, 8,9} (Figura 2)

Figura 2: Ciclo de vida del *Plasmodium*



Fuente: <http://www.anlis.gov.ar/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm>

1.1. EPIDEMIOLOGIA

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que la malaria afectó entre 300-500 millones de personas y causó la muerte a una población de 1.7 a 2.5 millones de seres humanos en todo el mundo para el año 1997⁹ (figura 3). Para el año 1999, la población de la región de las Américas ascendía a 818 millones de habitantes, de los cuales 299 millones (36.5%) vivían en zonas de condiciones ecológicas propicias para la transmisión de la malaria. De los 35 países y territorios que son miembros de la Organización Panamericana de Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), 21 informan tener zonas con transmisión activa de malaria.¹⁰

Figura 3. Mapa de las zonas con transmisión de malaria en el mundo



Fuente: http://www.cdc.gov/malaria/distribution_epi/distribution.htm

En Colombia, la malaria es responsable de uno de los principales problemas de salud pública ya que el 85% de la extensión total del territorio nacional, se considera, que reúne las condiciones de temperatura y humedad necesarias para

la existencia de la fauna anofelina indispensable para la transmisión de malaria.¹¹ En el departamento de Sucre se registraron variaciones en los casos de malaria registrados por DASSALUD-Sucre desde el año 1996 hasta el año 2004.⁷ (Grafico 1).

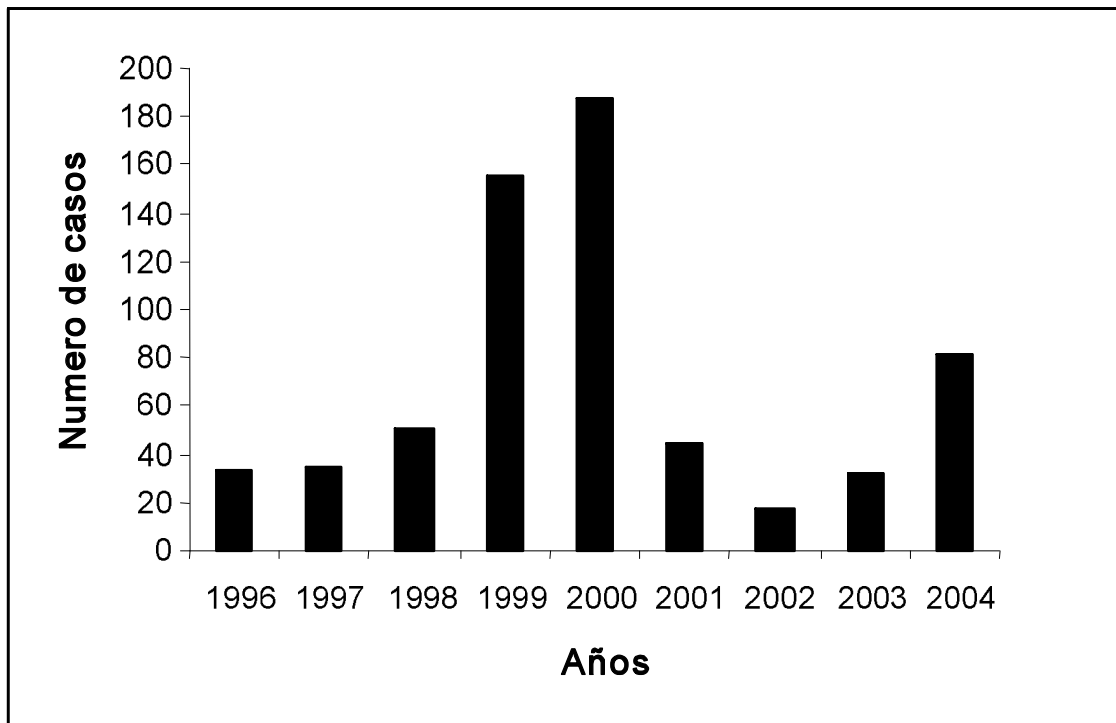


Grafico 1. Relación de casos de malaria registrados por DASSALUD en el departamento de Sucre año 1996 – 2004.

1.2. PATOLOGIA Y SINTOMATOLOGÍA

Los aspectos más característicos del paludismo son: anemia, pigmentación de ciertos órganos e hipertrofia del hígado y especialmente del bazo. La anemia, de tipo microcítico hipocrómico, puede no solo ser producida por la pérdida de eritrocitos como resultado de su destrucción por el parásito, sino también por la interferencia con la hematopoyesis por mayor fagocitosis de eritrocitos y como resultado de hemorragia capilar y trombosis. En casos crónicos y en especial durante la caquexia palúdica la anemia es particularmente notable. La

pigmentación observada en tejidos de pacientes palúdicos es causada por la fagocitosis de hemozoina (pigmento palúdico). El hígado se agranda debido a la congestión en el paludismo severo y aumenta considerablemente en una infección aguda; el bazo, el órgano mas afectado, está agrandado como resultado de la congestión malárica. Los cambios en la médula ósea aunque mucho menos notables son similares a los observados en el bazo. Los paroxismos periódicos del paludismo se repiten cada 48 o 72 horas dependiendo de la especie de *Plasmodium* al ocurrir la liberación de los parásitos por lisis de los eritrocitos, el escalofrío inicial que dura 15 minutos a una hora, vómito y dolor de cabeza es frecuente en este momento. El período febril que le sucede dura varias horas y se caracteriza por una fiebre en pico que alcanza 40°C o más, luego de esto la fiebre declina y el enfermo se duerme y más tarde despierta sintiéndose relativamente mejor.^{1,6}

1.3. EL VECTOR *Anopheles sp.*

Los vectores de malaria son insectos dípteros que pertenecen a la familia *Culicidae*, subfamilia *Anophelinae*. La mayoría de los *Anopheles*, tienen alas con escamas claras y oscuras, arregladas en pequeños bloques o áreas en las nervaduras de las alas. El número, longitud y arreglo de estas áreas oscuras y pálidas difiere considerablemente en varias especies y suministran caracteres útiles para su identificación.

Un *Anopheles* adulto se caracteriza por un scutellum redondeado, sin cerdas pronotales posteriores, genitalia masculina sin lóbulo basal en el gonocoxito; en ambos sexos, los palpos son tan o mas largos que la probosis, posee un par de antenas las cuales presentan dimorfismo sexual muy evidente, en los machos son plumosas y en las hembras filiformes¹², y en reposo asumen una posición oblicua, casi perpendicular al sustrato. Los machos son ligeramente de menor tamaño midiendo entre 3 y 8 mm de longitud (figura 4). Los anofelinos son holometábolos, cuyo estadio larval se reconoce por carecer de sifón respiratorio y por poseer

cerdas palmeadas en casi todos los segmentos abdominales, que le permiten estar en posición horizontal en la superficie del agua.⁶

Figura 4. *Anopheles* hembra alimentándose



Fuente: www.inmca.us/education/lifecycle/ic7.jpg

1.3.1. Ecología del vector

1.3.1.1 Criaderos

La mayoría de los *Anofelinos* explotan una gran variedad de hábitat; estos pueden ser permanentes o semipermanentes (charcas, orillas de lagos, diques, pantanos, etc.); recipientes naturales (huecos en árboles y rocas, axilas de bromelias y plantas etc.) y artificiales (latas vacías, llantas, tanques de depósito de agua); cursos lentos de agua dulce; colección de aguas temporales como son pequeños charcos, huellas de pisadas de carros, animales y humanas. También puede encontrarse en aguas salobres.

Aunque las condiciones fisicoquímicas y ecológicas de los criaderos, varía con cada especie, por lo general, ellos deben contener agua dulce, vegetación emergente (pasto, algas, etc.). Y un nivel de polución bajo.⁶

1.3.1.2 Ciclo de vida de *Anopheles sp.*

Hay cuatro diferentes fases en el ciclo de vida del mosquito, de los cuales el adulto es la fase voladora, (Figura 5). Las hembras adultas de los *Anofelinos* se alimentan de sangre aproximadamente cada dos o tres días. Esto es necesario para el desarrollo de los huevos, los cuales son normalmente puestos antes de volver alimentarse. El tiempo requerido para la digestión de la sangre ingerida y el desarrollo del huevo varía con la temperatura y la humedad del aire.⁶

Los huevos son colocados en el agua en grupos de 100-150. Los sitios para colocar los huevos varían desde pequeñas cantidades de agua residual en lugares tales como latas con desechos de comida, vaina de coco y huellas de pisadas, a grandes áreas de aguas en arroyos, canales, ríos, estanques y lagos. Cada especie de mosquito prefiere una clase particular de superficie de agua en la cual colocará sus huevos.

Los mosquitos hembras continúan colocando los huevos a lo largo de toda su vida. La mayoría realiza entre una y tres posturas, aunque unos pocos casos algo más de 13 posturas han sido reportados. Bajo las mejores condiciones el promedio de vida de mosquitos hembras *Anofelinas* es alrededor de dos a tres semanas.

Después de dos a tres días, los huevos se rompen y las larvas de los mosquitos emergen. La larva generalmente vive justo debajo de la superficie del agua (aunque ellas necesitan respirar aire) y toman el alimento del agua. Si son perturbadas, la mayoría de larvas nadan rápidamente al fondo del agua, regresando pronto a la superficie para respirar; ciertas especies, sin embargo, se mueven rápidamente de forma oblicua justo debajo de la superficie.

Hay cuatro estados larvales o instars. El tiempo requerido para el desarrollo de los diferentes estados depende de varios factores, incluyendo temperatura del agua: el periodo de desarrollo es más corto en agua caliente que en agua fría.

La larva más pequeña que emerge del huevo es llamada el primer instar. Después de uno a dos días esta muda su piel y comienza el segundo instar; en un intervalo de dos a tres días el tercer y cuarto instars aparecen. En áreas tropicales a una temperatura normal del agua, el estado larval dura alrededor de 8 a 10 días. Finalmente, el cuarto instar se desarrolla a pupa.

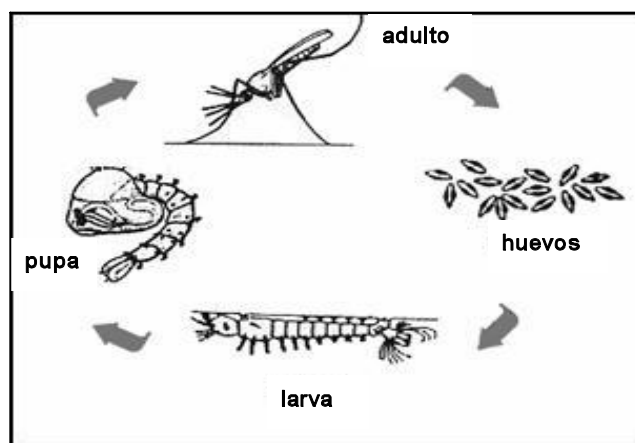
Es en este estado pupal, el cual dura por dos o tres días a temperaturas tropicales, tiene lugar la principal transformación, el organismo acuático cambia hasta un mosquito adulto capaz de volar. La pupa, tiene forma de una coma, se encuentra en la superficie del agua y nada cuando es perturbada pero no se alimenta. Su piel luego se rompe y el insecto adulto emerge y eventualmente vuela largas distancias. La hembra se aparea solo una vez, normalmente se alimenta de sangre y después se aparea y luego se desarrolla su primer grupo de huevos.

La mayoría de mosquitos Anofelinos se alimenta durante la noche, algunos al atardecer y otros alrededor de la media noche. Algunos entran a las casas y se alimentan, mientras que otros usualmente lo hacen fuera de las casas. Después de picar, los mosquitos usualmente reposan por un periodo corto. Los mosquitos que pican dentro frecuentemente reposan en una pared, bajo muebles o en ropa colgada. Los mosquitos que pican fuera en el extradomicilio pueden reposar en plantas, cavidades oscuras en el suelo o en otros lugares fríos y oscuros.

Los mosquitos pueden picar a personas como a animales. La preferencia hospedera difiere entre las especies; algunos mosquitos prefieren tomar sangre de humanos otros solo toman sangre animal. Estos que prefieren la sangre humana

son más peligrosos porque pueden transmitir la malaria. La incidencia en la transmisión puede variar con factores estacionales tales como temperatura, precipitación y humedad, los cuales tienen una influencia significativa en la población de mosquitos Anofelinos.

Figura 5. Etapas del desarrollo del mosquito *Anopheles*



Fuente: www.objectivistcenter.org/graphics/mosquitolifecycle.gif

1.4. TAXONOMIA

Dentro de la escala zoológica, los *Anofelinos* se ubican en la siguiente escala taxonómica:

Phylum: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Culicidae

Genero: *Anopheles*

Knight y Stone clasifican las especies del género *Anopheles* en seis subgéneros: *Anopheles*, *Celia*, *Kerteszia*, *Lophopodomyia*, *Nyssorhynchus* y *Stethomyia*¹². Sin embargo, los recientes conceptos de especies hermanas y complejos de especies

han introducido algunas dificultades en la clasificación de este género. Por otra parte, gracias a estudios citogenéticos (cromosomas politénicos, entrecruzamiento, etc.) se han establecido parámetros más precisos para la diferenciación de complejos de especies hermanas tales como el *A. gambiae*, *A. punctulatus*, *A. pseudopunctipennis* y *A. nuneztovari*.⁵

Las especies del género *Anopheles* se encuentran ampliamente distribuidas en la superficie terrestre. Se han descrito aproximadamente 364 especies de las cuales solo 54 son consideradas como de importancia primaria en la transmisión de malaria humana. Las especies que desempeñan el papel de vectores primarios de malaria en grandes áreas de América son: *A. albimanus*, *A. aquasalis*, *A. darlingi*, *A. nuneztovari* y *A. pseudopunctipennis*.^{1,5}

Colombia, por su situación geográfica y sus condiciones ecológicas, es uno de los países con mayor número de especies *Anopheles*; de 43 especies existentes, 9 se han encontrado naturalmente infectadas, éstas son: *A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. albimanus*, *A. nuneztovari*, *A. pseudopunctipennis*, *A. punctimacula*, *A. meadipunctatus*, *A. eiseni*, *A. (k) neivai*.² De estas se han reportado en el departamento de Sucre 3 especies *A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. punctimacula*.¹¹

1.5. MORFOLOGIA

El *Anopheles* es un insecto que presenta escamas sobre las alas, el cuerpo y las patas, posee un par de antenas alargadas y constituidas de 15 a 16 segmentos, con cerdas en la base de cada segmento; la probosis es alargada, de forma tubular, adaptada para succionar fluidos.¹³

1.5.1 Cabeza

Es relativamente pequeña y globosa, ocupada en gran parte por los ojos compuestos. En la cabeza se observan cinco tipos de apéndices: los dos primeros son las antenas, que consisten en un flagelo de 13 flagelómeros, un pequeño escapo, con forma de anillo y un pedicelo globular y desarrollado. En las antenas se presenta dimorfismo sexual, en las hembras los segmentos son filiformes, de escasas setas o pelos cortos, mientras que en los machos los primeros flagelómeros son cortos y cada uno está provisto de una arista de la cual se desprende un mechón de setas o pelos largos y numerosos. El tercer apéndice lo constituye la proboscis la forma y tamaño relativo de ésta son de interés taxonómico. Los dos últimos apéndices son los palpos maxilares conformados por cinco segmentos denominados palpómero.⁶

1.5.2. Tórax

Se compone de tres segmentos estrechamente unidos: pro, meso y metatórax. El prototórax es pequeño y dorsalmente está ocupado por el anteprenotum o lóbulo anteprenotal. El mesotórax es la región donde se insertan las alas y es la más desarrollada. El metatórax es muy pequeño y en el se encuentran los halterios, el espiráculo metatorácico y las patas posteriores.⁶

1.5.3. Patas

Son largas y están compuestas de cinco segmentos: coxa, trocánter, fémur, tibia y cinco tarsómeros. Los patrones de coloración y disposición de las escamas en los tres últimos segmentos de las patas son útiles en la diferenciación de grupos taxonómicos, en especial en Anopheles donde la disposición de escamas oscuras y claras en los tarsómeros sirve para diferenciar especies o grupos de especies.⁶

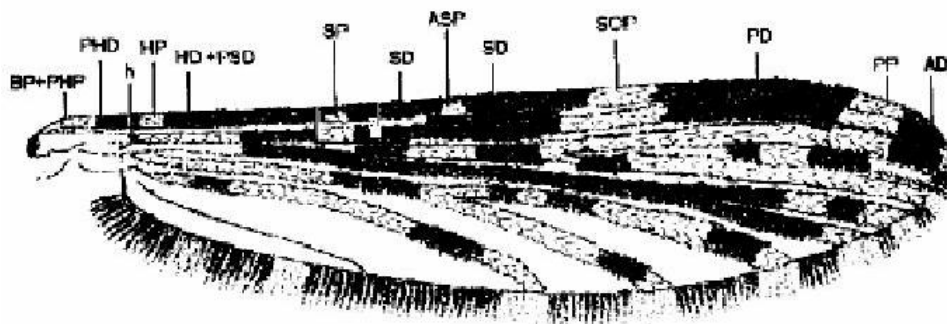
1.5.4. Alas

Las alas poseen seis venas longitudinales ramificadas y siempre cubiertas de escamas. Los nombres de las venas y celdas se ilustran en la figura 6. La disposición de escamas claras y oscuras formando manchas en las venas es un carácter morfológico muy importante para diferenciar especies de *Anopheles*.

1.5.5. Abdomen

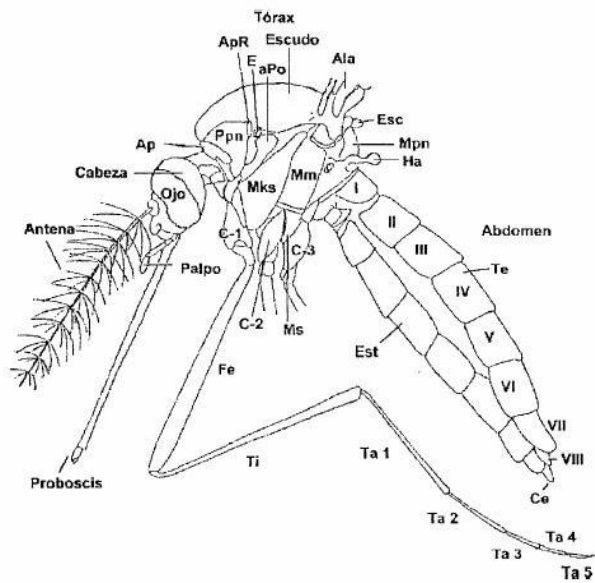
Está formado por diez segmentos; cada uno de ellos presenta un esclerito dorsal llamado tergítum y uno ventral llamado esternítum, unidos por un tejido membranoso y flexible, denominado membrana pleural. Los últimos tres segmentos suelen retraerse dentro del abdomen dejando visible únicamente los cerci en las hembras y la terminalia en los machos. En los *Anopheles* se presentan en el abdomen tufos caudolaterales de escamas (figura 7).

Figura 6. Ala de *Anopheles* del subgénero *Nyssorhynchus*. AD: Mancha apical oscura; PP: Mancha preapical clara; PD: Mancha preapical oscura; SCP: Mancha subcostal clara; SCD: Mancha subcostal oscura; ASP: Mancha sector clara accesorio; SP: Mancha sectorial clara; HD + PSD: Mancha humeral oscura + presectoral oscura; HP: Mancha humeral clara; PHD: Mancha prehumeral oscura o mancha basal oscura; BP+PHP: Mancha basal clara + Mancha prehumeral clara.



Fuente: <http://www.yenys.com.ar/pdfs/Dipteros-vectores-Bs-As-.pdf>

Fuente: <http://www.yenys.com.ar/pdfs/Dipteros-vectores-Bs-As-.pdf>.



2. ANTECEDENTES

2.1. CLASIFICACION TAXONOMICA DE LAS ESPECIES DE *Anopheles*.

Tradicionalmente la clasificación taxonómica de estos insectos se ha hecho a través de claves taxonómicas basadas en diferencias de caracteres morfológicos entre especies. A este nivel los caracteres utilizados son heterogéneos como lo demuestran estudios morfométricos y morfológicos en huevos, pupas, genitales de machos y hembras adultas de *A. darlingi*, *A. marajoara*, *A. argitarsis*, *A. braziliensis*, *A. benarrochi*, *A. rangeli*, *A. oswaldoi* y *A. triannulatus* que generalmente exhiben una morfología especie específica.^{15, 16, 17, 18,19}

A pesar de la gran variación morfológica específica observada en algunas especies de *Anopheles*, en otras, como las del subgénero *Nyssorhynchus* la diferenciación inter e intra especies es difícil, en ciertos casos, se basa en características morfológicas muy sutiles, el muestreo de machos al igual que el de estadios inmaduros (larvas o pupas), no provee información sobre el grado de asociación entre estas especies y los humanos; por tal razón, es esencial capturar e identificar hembras adultas en el momento de picar al hombre o en reposo en el domicilio¹⁷. Además de los problemas relacionados con la identificación por las claves existentes, es frecuente que los caracteres morfológicos se pierdan fácilmente cuando los especímenes no son frescos o han sufrido daños durante su manipulación. Las dificultades antes mencionadas hacen de manifiesto la necesidad de emplear nuevas herramientas para tratar de hacer una correcta asignación de los taxa en aquellos casos donde es difícil hacerlo basándose en los caracteres morfológicos.

Además; de los métodos tradicionales de identificación de especies por claves, se han desarrollado un sinnúmero de aproximaciones que permiten resolver problemas taxonómicos^{20, 21, 22,23}, si estos se usan en complementariedad dan una idea más exacta. Dentro este tipo de estudios se encuentran marcadores moleculares, isoenzimas, análisis cromosomales, PCR, clonación y secuenciación^{18,19,25}; los análisis cromosomales por ejemplo; han sido utilizados en discriminación de especies de *Ancpheles* crípticos de Sur América donde Peyton por similitud de genitalia masculina había colocado a *A. trinkae* como sinónimo menor de *A. dunhami*; sin embargo, su cromosoma X difería en cuanto a los brazos L y R presentes en esta especie pero ausente en *A. trinkae*; en este trabajo, de igual forma, se utilizaron isoenzimas obteniéndose loci diagnósticos, que diferenciaban las dos especies. Los huevos de las dos especies son distinguibles fácilmente por la corona anterior, largos flotadores y cuello cerrado que solo están presentes en *Ancpheles trinkae*; con los 18 primers utilizados en el RAPD-PCR se puede diferenciar *Ancpheles dunhami*, *A. trinkae*, *A. nuneztovari* y *A. dariingi* y establecer que *Ancpheles dunhami* esta mas cercanamente relacionado a *Ancpheles nuneztovari* que a *Ancpheles trinkae*¹⁹. En otros trabajos como el de Manguin y colaboradores en *A. dariingi*, la utilización de varios métodos ha sido de gran utilidad en cuanto a la estructura de la población de este vector¹⁸.

Con la aparición de las técnicas de biología molecular y, especialmente de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el secuenciamiento automatizado,^{23,24} el estudio del genoma en insectos vectores de enfermedades se ha convertido en un método muy importante en estudios taxonómicos y de evolución.

En los últimos años el ADN ribosomal y mitocondrial han despertado el interés de sistemáticos y entomólogos médicos, por las características particulares de estos

genomas que los hacen útiles para estudios de genética de poblaciones y filogenética²².

Al igual que en otros eucariotas, el ADN ribosomal de los insectos consiste de múltiples copias de unidades transcripcionales repetidas en tandem (Beckingham, 1982). Cada unidad transcripcional consiste de regiones que codifican para tres subunidades ribosomales (18S, 5.8S y 28S) las cuales están separadas por dos espaciadores no codificantes, espaciador transcrito interno 1 y 2 (ITS1 e ITS2) (Beckingham, 1982, Hillis y Dixon, 1991)²⁵. La secuencia espaciadora ITS2 se ha utilizado como marcador molecular para estudios filogenéticos de especies relacionadas; esta posee secuencias no conservadas, flanqueadas por regiones altamente conservadas lo que facilita la construcción de cebadores para ensayos de PCR. Algunos trabajos realizados con la secuencia ITS2 como marcador molecular han permitido la identificación de algunos complejos de especies de *Anopheles* como *A. maculipennis*, *A. gambiae*, *A. punctulatus*, *A. nuneztovari*, *A. quadrimaculatus*, entre otros^{20, 21, 25}. De igual forma, se han realizado numerosos estudios en cuanto a la heterogeneidad intragenómica en especies de *Anopheles* como *A. nuneztovari*, *A. oswaldoi*, *A. danirigi*, gracias a estos se ha podido establecer si las poblaciones de un área geográfica determinada pueden ser especies separadas genéticamente a pesar de su similitud morfológica o pertenecer a un complejo de especies. También nos indica si existe homogeneidad por el proceso de evolución concertada entre las especies de un determinado rango geográfico^{25, 26, 27}.

Por otro lado, la molécula mitocondrial completa ha sido secuenciada en las especies de género *Anopheles*: *A. gambiae* y *A. quadrimaculatus*.^{28, 29} Los haplotipos mitocondriales, definidos como secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que difieren de una secuencia homóloga por, al menos, una sustitución nucleotídica o el reemplazo de un aminoácido, han sido muy útiles para estudiar la variabilidad genética en poblaciones naturales y estimar los niveles de

flujo genético entre dichas poblaciones. Los genes utilizados en estos estudios incluyen la región 3' de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa (ND4), el gen mitocondrial que codifica para la proteína del citocromo b, los genes de la subunidad pequeña ribosomal (SRU) y la subunidad larga ribosomal (LRU) y el gen de la citocromo C oxidasa (Cox I).²⁸

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar mediante claves taxonómicas las especies de *Anopheles* presentes en los municipios de San Onofre y Morroa (Sucre)

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Realizar un inventario de las especies de *Anopheles* presentes en la zona urbana de los municipios de San Onofre y Morroa mediante claves taxonómicas.
2. Determinar las especies de *Anopheles* que tienen mayor prevalencia en estos municipios.
3. Retroalimentar a los servicios de salud pública y los grupos de atención e investigación con el propósito de proponer políticas para el manejo integral de la enfermedad.

4. METODOLOGIA

4.1. FASE DE CAMPO

Las muestras fueron recolectadas en los municipios de San Onofre (09°44'24" latitud norte, 75°31'40" longitud oeste) y Morroa (09°20'12" latitud norte, 75°18'31" longitud oeste) (Anexo A), Departamento de Sucre, se realizó la captura de mosquitos en fase adulta atraídos mediante cebo humano protegido, en el peri e intradomicilio, desde las 7:00 p.m. hasta las 3:00 a.m., durante los meses de febrero a julio; La recolección de las muestras se llevó a cabo cuatro días a la semana en la zona urbana de ambos municipios.

Las muestras recolectadas se preservaron con silica gel en microtubos eppendorf de 0.5 ml en forma individual, debidamente rotulados luego fueron llevadas al laboratorio para su posterior revisión taxonómica.

4.2. FASE DE LABORATORIO

4.2.1. Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó tomando en consideración las claves de Faran y Faran Linthicum^{4,30}; teniendo en cuenta características específicas del ala, de la pata, y del abdomen. En cuanto al patrón de manchas en las alas se midió la relación entre mancha clara humeral / mancha oscura basal, Mancha clara subcostal / mancha oscura subcostal, en el mesanepimero se tuvo en cuenta ausencia o presencia de mancha clara, en la pata se midió la relación de la mancha oscura basal del tarsómero posterior 2 con la longitud total del tarsómero, además de la ausencia o presencia de la mancha oscura basal en el tarsómero

posterior 5. En el abdomen se tuvo en cuenta desde que segmento se presentaban los tufos de escamas, en los palpómeros la coloración de los mismos. Los patrones morfométricos para grupo de especie fueron analizados con las claves antes mencionadas.

4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La región ITS2 del ADN ribosomal fue amplificada usando los cebadores, 28SR (5'-ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC-3') y 5.8SF (5'-ATC ACT CGG CTC GTG GAT CG-3')³¹. Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se utilizaron 50 µl del cóctel el cual contenía lo siguiente: (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.5) dNTPs 2 µM, MgCl₂ 25 mM, 5µM de cebadores para completar la mezcla de PCR se empleó de 1-2 unidades de Taq polimerasa, se adicionó agua destilada hasta completar el volumen requerido y se llevó a vortex por dos segundos. Luego se distribuyeron en alícuotas de 50 µl que fueron pipeteadas en tubos de PCR de 500 µl y se adicionó por último una pata de mosquito en cada tubo.

Las muestras fueron llevadas a un termociclador de PCR express (Hybaid) programado a: Un ciclo inicial de denaturación a 94°C por 2 minutos 35 ciclos repetidos de denaturación, alineamiento y extensión a 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos Finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos; como control negativo se usó agua destilada y estéril, en reemplazo del ADN en la mezcla de reacción.

4.2.3. Restricción enzimática

Luego de la amplificación del ITS2 se procedió a la restricción enzimática de los productos del PCR. La enzima que se utilizó fue Hae III la cual permite

diferenciar *A. nuneztovari* de *A. equasalis*, ya que se producen dos fragmentos en la primera especie y no hay corte en la secuencia de la segunda. (Anexo B ,C)

La mezcla de reacción para la restricción contenía 2µl de buffer M (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50mM) 13.5 µL de agua, 0.5 µL de enzima y 4 µL del producto de PCR. Se le hizo un vortex y se llevó a la incubadora a 37°C durante toda la noche.

4.2.4. Análisis de los productos de PCR.

La electroforesis en gel de agarosa se realizó según protocolo previamente estandarizado³². Los productos de PCR y los de restricción enzimática se analizaron mediante electroforesis horizontal estándar sobre gel de agarosa al 2% teñido con 5 µg / ml de solución de Bromuro de Etidio e inmerso en un tanque de electroforesis que contenía buffer TBE (Tris; ácido bórico y 0.5mM EDTA pH 8.0). Se utilizaron los marcadores de peso molecular (φ x 174). La electroforesis se realizó a 90 voltios durante una hora y 30 minutos, posteriormente el gel se transfirió a un trasluminador ultravioleta donde se visualizaron los productos de PCR y los de restricción y se tomaron las respectivas fotografías con cámara digital (Sony).

5. RESULTADOS

5.1. AREA DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en dos municipios del departamento de Sucre, San Onofre y Morroa, el primero pertenece a la sub-región Morrosquillo.

Según el Censo de 1993 proyectado a 2000 cuenta con una población de 47.025 habitantes equivalente al 6.18% de la población total del departamento, con una densidad de 42.9 habitante por Km.² de los cuales el 64.26% corresponde a la cabecera municipal y el 35.74% a la zona rural.

El clima predominante es cálido seco con una temperatura promedio de 27.3°C. La altura sobre el nivel del mar es de 55 metros con una pluviosidad de 1400 mm anuales, la humedad relativa promedio es de 85%, el promedio mas alto se presenta en el mes de junio y los valores mas bajos en los primeros meses del año; la zona de influencia regional del municipio, esta enmarcada dentro del régimen húmedo seco (Strhaller y Strhaller, 1976), en cuanto a los vientos locales se determinó que la velocidad promedio anual es de 2.3 m/seg con una oscilación de 1.9 a 3.3 m/seg.

En el municipio la precipitación ocurre durante el año en dos épocas definidas: una época seca o de verano durante los meses de noviembre a marzo y otra época de lluvias o invierno desde finales de abril hasta octubre. El área de trabajo fue la finca Moñito, ubicada en la cabecera municipal, esta presenta un lago perenne, con plantas acuáticas como buchón de agua (*Hydromystia stolonifera*), taruya (*Eichornia azurea*), alrededor del mismo se encuentran arbustos de corozo (*Acrocomia antioquiensis*).

En general en las viviendas del área urbana se caracterizan por ser de paredes de cemento, en el caso de la finca Moñito además de este tipo de construcción poseen caney que son estructuras de palma sin paredes que utilizan como cocina y lugares de descanso; a su alrededor se encuentran corrales del ganado vacuno, equino, caprino y porcino, al igual que aves de corral y perros. La vegetación consiste en arbusto del tipo cerezo (*Pronus capuii*), árboles de mango (*Mangifera indica*), roble (*Tabebuia roseae*), mamón (*Annona reticulata*), entre otros.

El municipio de Morroa pertenece a la sub-región de Montes de María, cuenta con una población de 11.807 habitantes y su temperatura media es de 27°C. Las capturas se realizaron en la parte Nororiental del municipio, en el barrio la Parroquia, este se encuentra bordeado por el arroyo Morroa y algunas fincas dedicadas a la ganadería y agricultura, las casas del barrio son en su mayoría de palma y bahareque. La vegetación consiste en árboles frutales, plantas ornamentales las cuales están muy próximas a las viviendas.

El muestreo se realizó durante el período comprendido entre febrero y agosto de 2003, la mayor captura de especímenes de mosquitos se efectuó en los meses de mayo, junio y julio, siendo mayor en este último, lo cual coincidió con el incremento de las precipitaciones en la región. (Grafico 1)

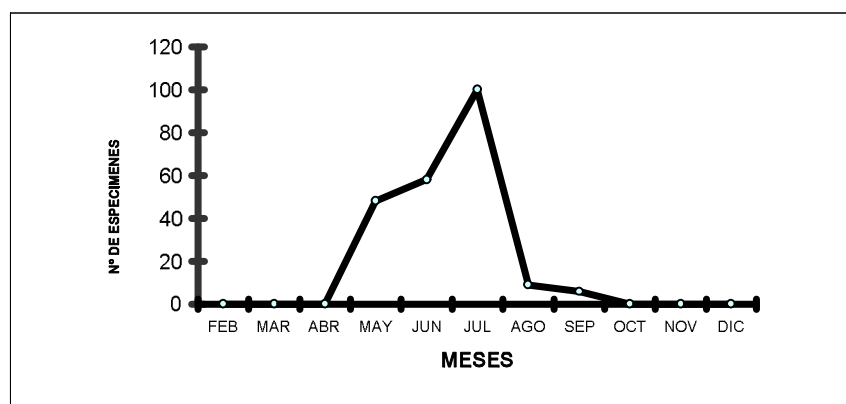


Grafico 1. Relación de captura de especímenes por meses de muestreo. La mayor captura se realizó durante el mes de Julio, lo que coincide con la época de mayor pluviosidad.

En total se analizaron 221 muestras las cuales fueron clasificadas por claves morfológicas³⁰ como *A. albimanus*, *A. triannulatus*, *A. nuneztovari*, *A. marajoara*, *A. aquasalis* (especie no confirmada por falta de pruebas moleculares) y *A. pseudopunctipennis*. (Gráfico 2), El 14 % de las muestras no pudieron ser clasificadas por la carencia de las patas traseras, escamas o por deterioro y presencia de hongos por esto fueron consideradas como *Anopheles sp.*

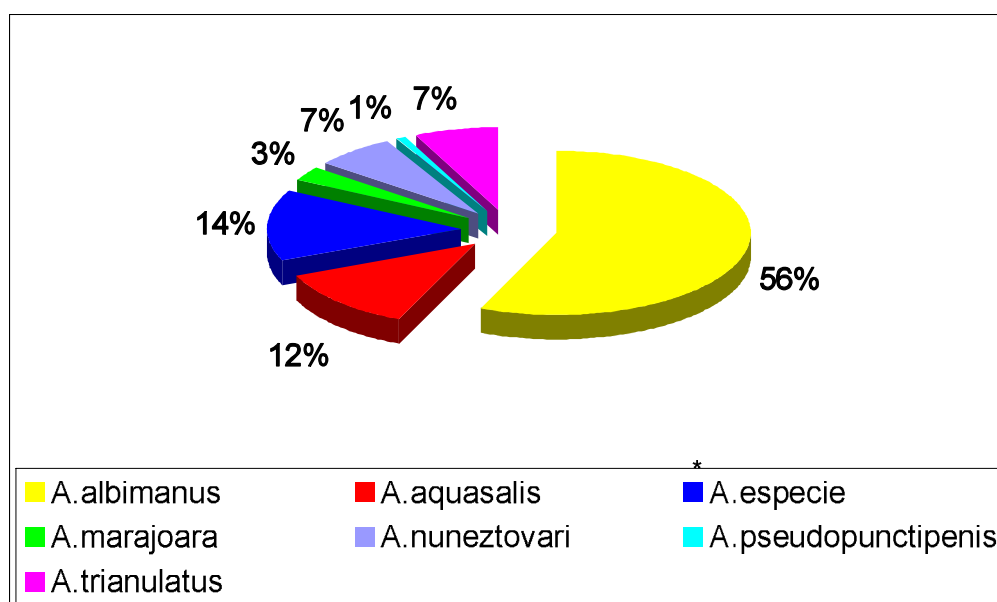


Grafico 2. Porcentaje de especies recolectadas durante el periodo de muestreo.

En el municipio de San Onofre se encontraron las mismas especies que en el municipio de Morroa exceptuando a *Anopheles pseudopunctipennis* que sólo fue encontrado en Morroa. En San Onofre el número de casos de malaria reportados en los últimos años ha sido bajo, mientras que en Morroa no se ha reportado presencia de la enfermedad a pesar de encontrarse vectores primarios y secundarios en ambas regiones (Tabla 1).

El mayor número de especímenes que se obtuvo en una sola captura fue realizada en el municipio de Morroa con 47 ejemplares, mientras que en San Onofre fue de 25 ejemplares.

ESPECIE	LUGAR DECAPTURA	CAPACIDAD VECTORIAL
<i>A. albimanus</i>	San Onofre-Morroa	Primario
<i>A. aquasalis</i>	San Onofre-Morroa	-----
<i>A. triannulatus</i>	San Onofre-Morroa	-----
<i>A. nuneztovari</i>	San Onofre-Morroa	Primario
<i>A. marajoara</i>	San Onofre-Morroa	-----
<i>A. pseudopunctipennis</i>	Morroa	Secundario

Tabla 1. Especies de *Anopheles* capturados en los municipios de Morroa y San Onofre en el año 2003.

Especies	Características	Media	D. Estándar	Rango	Rango en Literatura
<i>Anopheles nuneztovari</i> N= 9	Tall2	0.34	0.023	0.33 - 0.38	0.20 - 0.31
	HC/PHO	0.8	0.372	0.30 - 1.50	0.70 - 1.70
	SCC/SCO	0.21	0.0677	0.08 - 0.27	0.20 - 0.55
<i>Anopheles albimanus</i> N= 119	Tall2	0.45	0.034	0.40 - 0.66	0.4 - 0.8
	HC/PHO	1.7	0.3039	0.60 - 3.0	0.95 - 2.50
	SCC/SCO	0.32	0.073	0.20 - 0.47	0.25 - 0.40
<i>Anopheles aquasalis</i> * N= 27	Tall2	0.57	0.072	0.40 - 0.56	0.3 - 0.6
	HC/PHD	1.52	0.242	1.0 - 2.3	1.5 - 3.5
	SCC/SCO	0.29	0.051	0.25 - 0.41	0.3 - 0.5
<i>Anopheles triannulatus</i> N= 17	Tall2	0.48	0.037	0.42 - 0.52	0.40 - 0.70
	HC/PHO	1.47	0.28	0.60 - 1.60	0.50 - 1.30
	SCC/SCO	0.31	0.089	0.21 - 0.45	0.10 - 0.20
<i>Anopheles marajoara</i> N= 5	Tall2	0.44	0.099	0.32 - 0.60	0.45 - 0.90
	HC/PHO	1.58	0.53	0.75 - 2.0	0.22 - 1.00

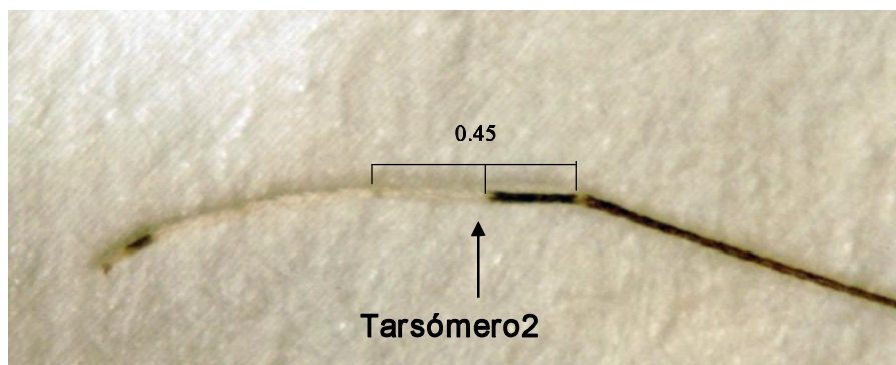
Tabla 2. Valores medios y rangos de la mancha oscura basal del tarsómero 2 de la pata posterior con relación a la longitud total del tarsómero (Tall2), proporción entre la longitud de la mancha clara humeral (HC) de la vena costa y la longitud mancha oscura basal (MOB) de la misma vena (HC / MOB), proporción (SSC / SCO) de la longitud de la mancha clara subcostal (SCC) de la vena costa con relación a la mancha oscura subcostal (SCO), datos comparadas con el rango reportado por Faran, 1980.

5.2 CLASIFICACION MORFOLOGICA

- *Anopheles albimanus*, La morfología corresponde con lo descrito por Faran 1980 en la cual identifica esta especie por la presencia de un anillo oscuro en la base del tarsómero 5 posterior, el rango de la banda basal oscura del tarsómero posterior II (0.40 – 0.80) se ajustó a nuestros resultados en los que encontramos un rango comprendido entre 0.40 – 0.66; la ausencia de penachos de escamas caudolaterales en el tergo abdominal II y el palpómero cuarto oscuro son característicos de esta especie. (Fotografía 1 – 2)

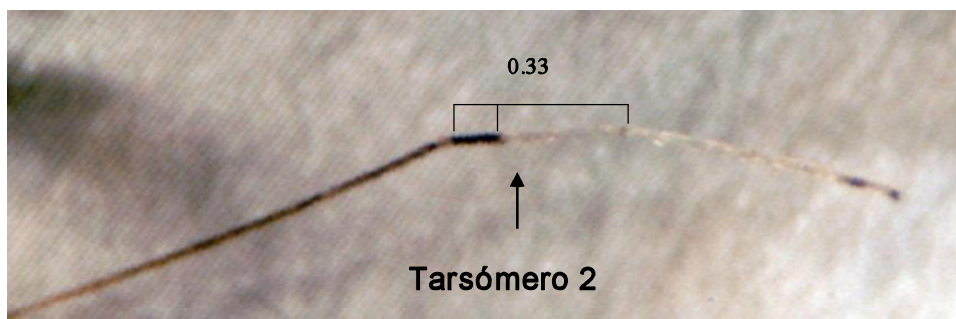


Fotografía 1. Cabeza de *Anopheles albimanus* en la cual se observa el palpómero 4.

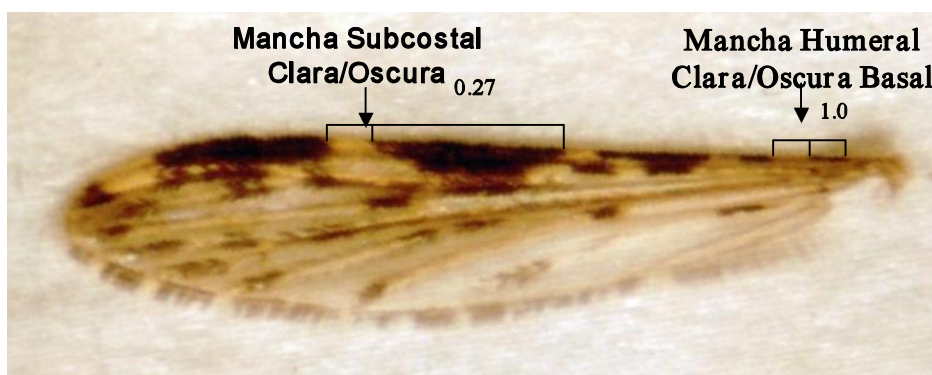


Fotografía 2. Relación de la longitud de la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero.

- *Anopheles nuneztovari*, se caracteriza por presentar tarsómero posterior 5 con un anillo basal oscuro, penacho de escamas caudolaterales presentes en los segmentos abdominales II al VII, longitud de la banda basal oscura del tarsómero posterior dos de 0.20 a 0.32 rango que difiere ligeramente con nuestros resultados que están entre 0.33 – 0.38 (Fotografía 3) ; la longitud de la mancha subcostal clara de la costa es menos de 0.50 veces la mancha subcostal oscura valor en el cual se incluye el rango observado en el presente estudio que es de 0.08 – 0.27 veces la longitud de esa mancha. La mancha clara humeral es 0.7 – 4.5 veces la longitud de la mancha oscura basal en nuestro caso fue de 0.7 a 1.70 incluido en el rango reportado por la literatura. (Fotografía 4)

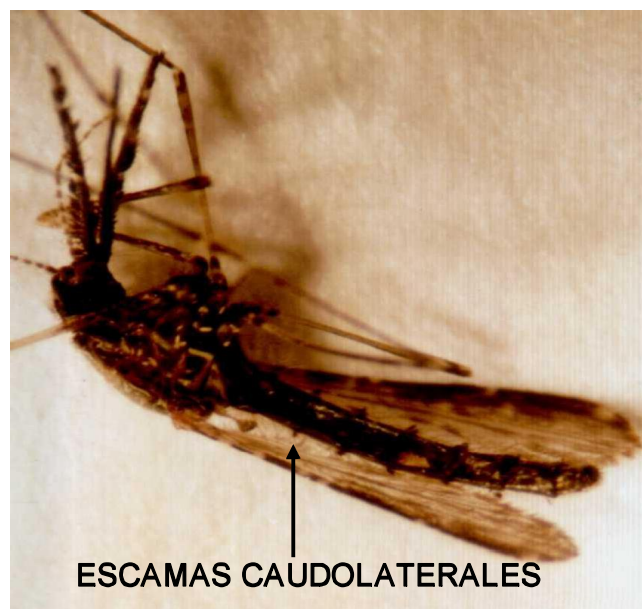


Fotografía 3. Relación de la longitud de la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero.

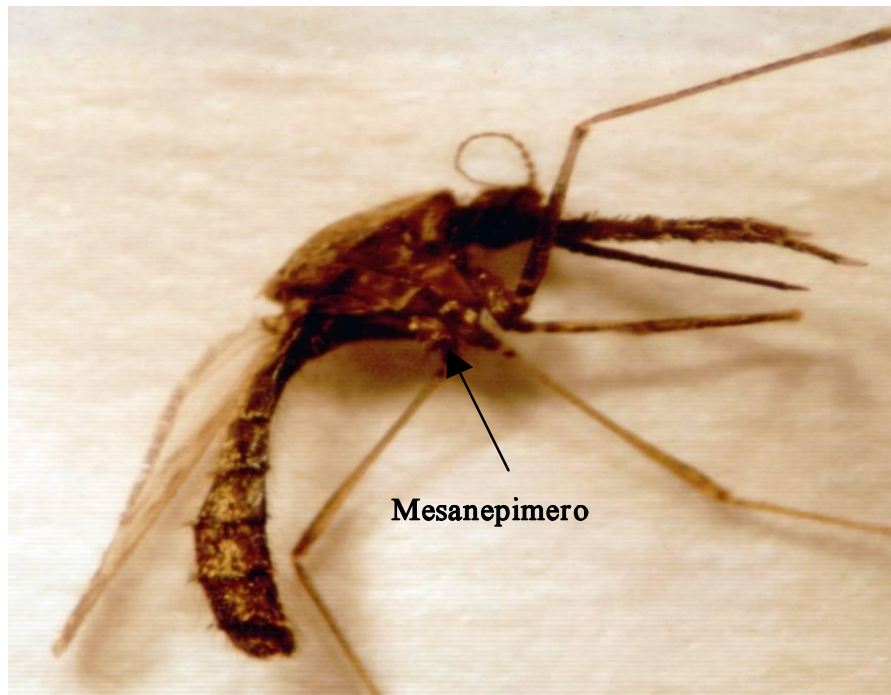


Fotografía 4. Detalles del ala de *A. nuneztovari* donde se muestra la relación de las manchas clara humeral / oscura basal y subcostal clara / subcostal oscura.

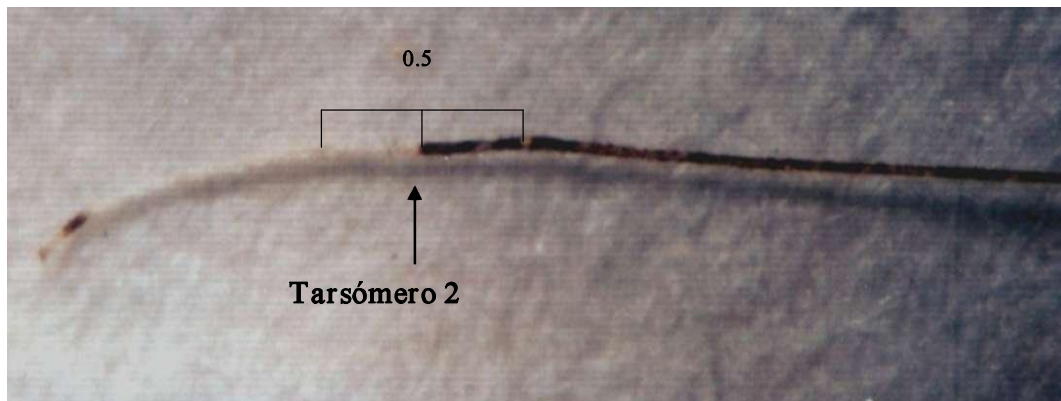
- *Anopheles triannulatus*, Faran en la revisión de 1980 lo describe como una especie pequeña, la que se identifica por presentar penacho de escamas caudolaterales en los tergos abdominales del II al VII (fotografía 5), mesanepímero con un penacho de escamas claras (fotografía 6), la longitud de la banda basal oscura del tarsómero posterior II varía de 0.40 – 0.70, este rango abarca lo encontrado en este trabajo (0.42 – 0.52) (fotografía 7); la longitud de la mancha clara humeral de la costa está entre 0.50 – 1.30 veces la longitud de la mancha oscura basal en este trabajo se encontró que el valor de esta medida es de 0.60 – 1.60, la longitud de la mancha clara subcostal varía de 0.21 – 0.45 veces la longitud de la subcostal oscura en nuestro trabajo se observa una variación del reporte de Faran 1980 que está en el rango de 0.10 – 0.20 veces esta medida (Fotografía 8).



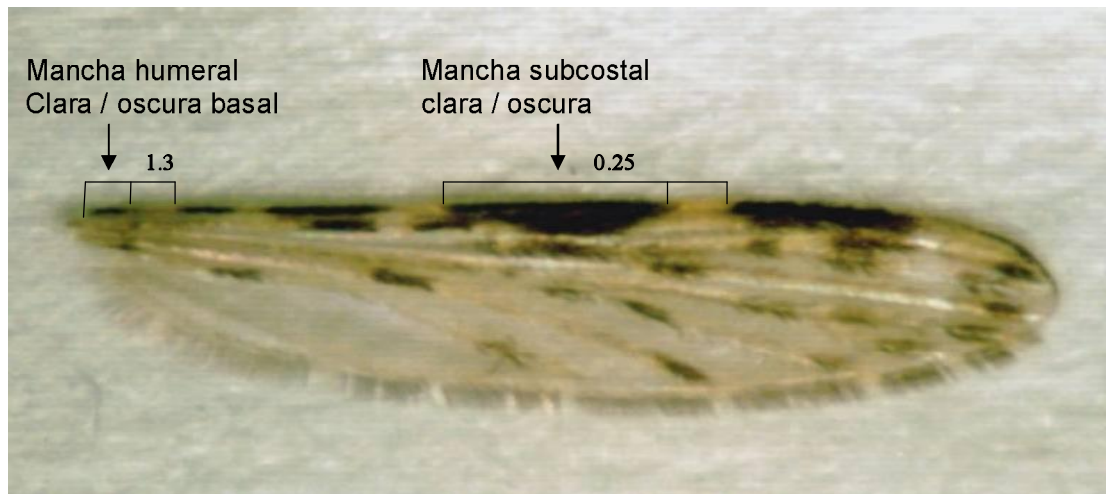
Fotografía 5. Penacho de escamas caudolaterales presentes en el segundo segmento abdominal.



Fotografía 6. Penacho de escamas claras en el mesanepimero

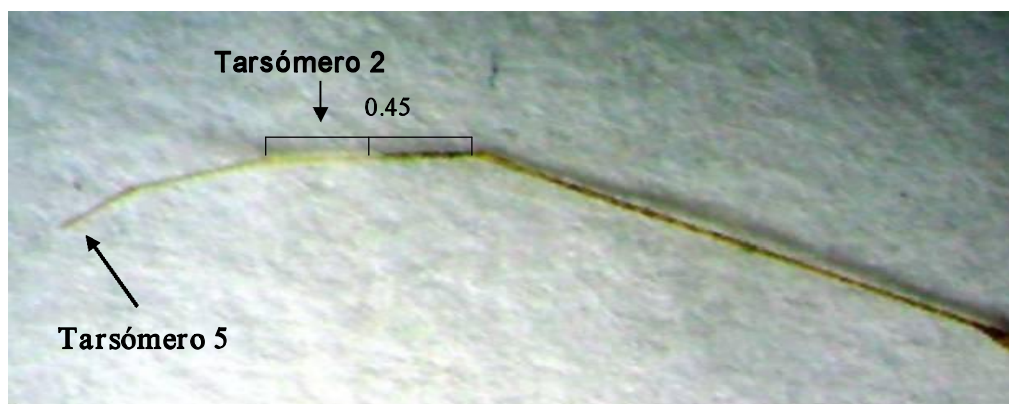


Fotografía 7. Relación de la longitud de la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero



Fotografía 8. Relación de la medida de mancha clara humeral / basal oscura y de la subcostal clara / subcostal oscura.

- *Anopheles marajoara*, En la descripción de Faran y Linthicum se identifica por presentar el tarsomero posterior 5 totalmente claro (Fotografía 9), penachos de escamas caudolaterales bien desarrollados a partir del tergo III, en nuestro trabajo la longitud de la banda oscura del tarsomero posterior II está comprendida entre 0.32 – 0.60 la longitud total del tarsomero (Fotografía 9), este valor difiere ligeramente de lo reportado en la literatura (0.45 – 0.90), la longitud de la mancha clara humeral de la costa varia en este trabajo (0.75 – 2.0) de lo reportado por Faran y Linthicum (0.22 – 1.0), (Fotografía 10).



Fotografía 9. Pata posterior de *Anopheles marajoara* en la que se muestra la relación de la banda oscura basal con respecto a la longitud del tarsómero y la ausencia de la banda oscura basal de tarsómero 5.

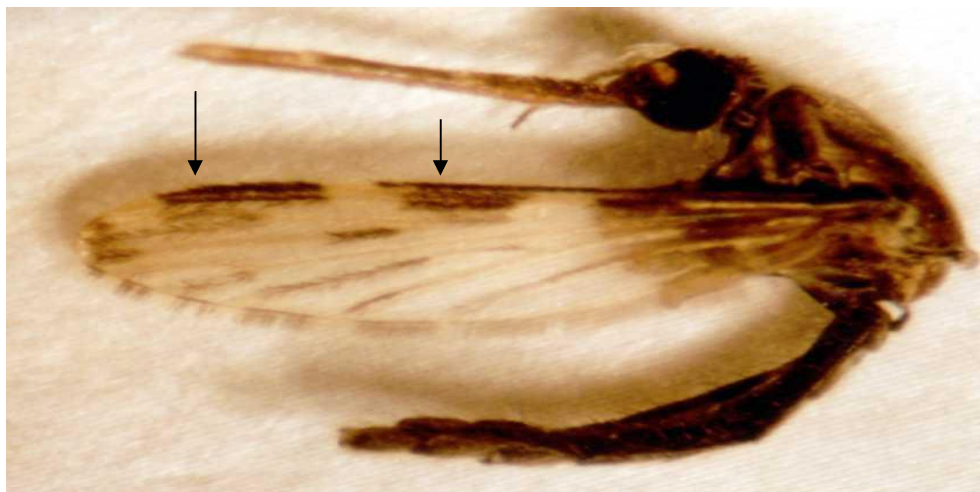


Fotografía 10. Relación de la mancha clara humeral / oscura basal. En la imagen la mancha subbasal oscura esta ausente por tal motivo la mancha clara humeral se observa muy grande.

- *Anopheles pseudopunctipennis*, es una especie perteneciente al subgénero *Anopheles*, que se caracteriza por presentar tarsómeros totalmente oscuros (Fotografía 11), ausencia de penachos de escamas en tergos abdominales y el ala presenta dos manchas oscuras (Fotografía 12) lo que permite una fácil identificación.



Fotografía 11. Muestra los tarsómeros 1-5 oscuros característicos de *A. pseudopunctipennis*.

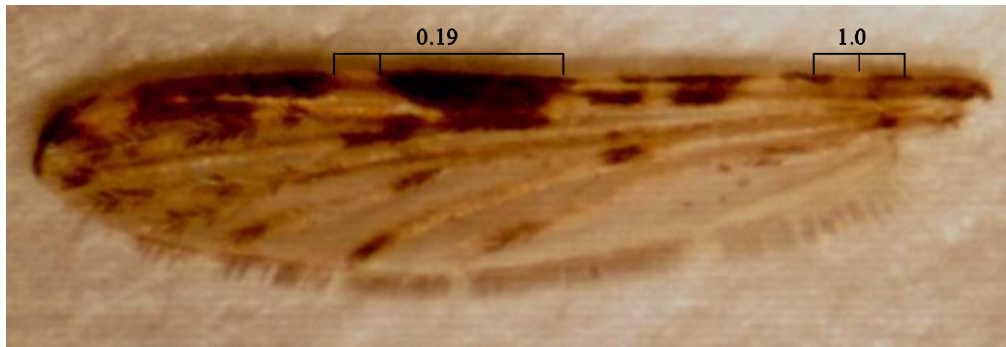


Fotografía 12. Detalles del ala de *A. pseudopunctipennis*. En la cual se observan solo dos manchas en la vena costa.

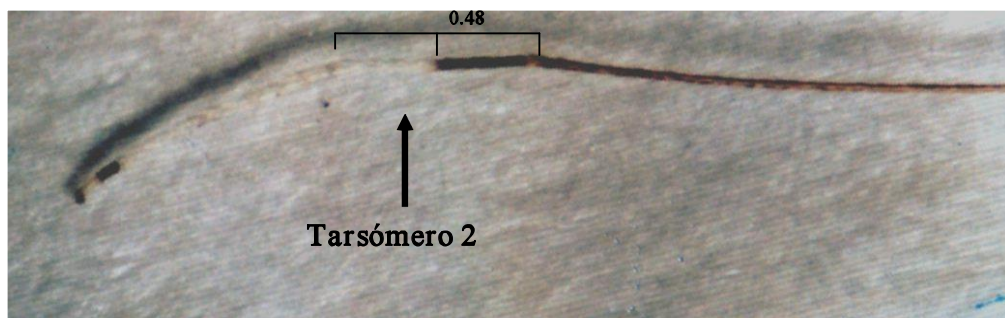
- *Anopheles aquasalis*, se caracteriza por la presencia de escamas caudolaterales desde el segundo segmento abdominal (Fotografía 13), la longitud de la banda basal oscura del tarsómero posterior II esta entre 0.40 – 0.56 de la longitud del tarsómero (Fotografía 14), este rango es aproximado a lo reportado por Faran 1980 (0.30 – 0.60); la longitud de la mancha cara humeral fue de 1.0 – 2.3 veces la longitud de la mancha oscura basal (Fotografía 15), valor que se encuentra contenido en el rango reportado por Faran es de 1.5 – 3.5; la longitud de la mancha clara subcostal fue de 0.25 – 0.41 veces la longitud de la mancha oscura subcostal, valor contenido en lo reportado por Faran, 1980(0.3 – 0.50), (Fotografía 15).



Fotografía 13. Penacho de escamas presentes en el segundo segmento abdominal.



Fotografía 14. Relación de la medida de la banda basal oscura con respecto a la longitud total del tarsómero.



Fotografía 15. Muestra la relación de la mancha oscura basal / mancha clara humeral y subcostal oscura / subcostal clara.

5.3 ANALISIS MOLECULAR DE ANOPHELES SP.

5.3.1 Ensayo de PCR

Los especímenes utilizados para las pruebas moleculares fueron identificados como *A (N) nuneztovari* por claves morfológicas ; inicialmente se realizaron ensayos con una concentración de los cebadores de 5 μ M según lo recomendado en las metodologías de trabajo del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), pero la banda obtenida en la electroforesis fue difusa y atípica en cuanto al peso del fragmento; por esta razón se modificaron las

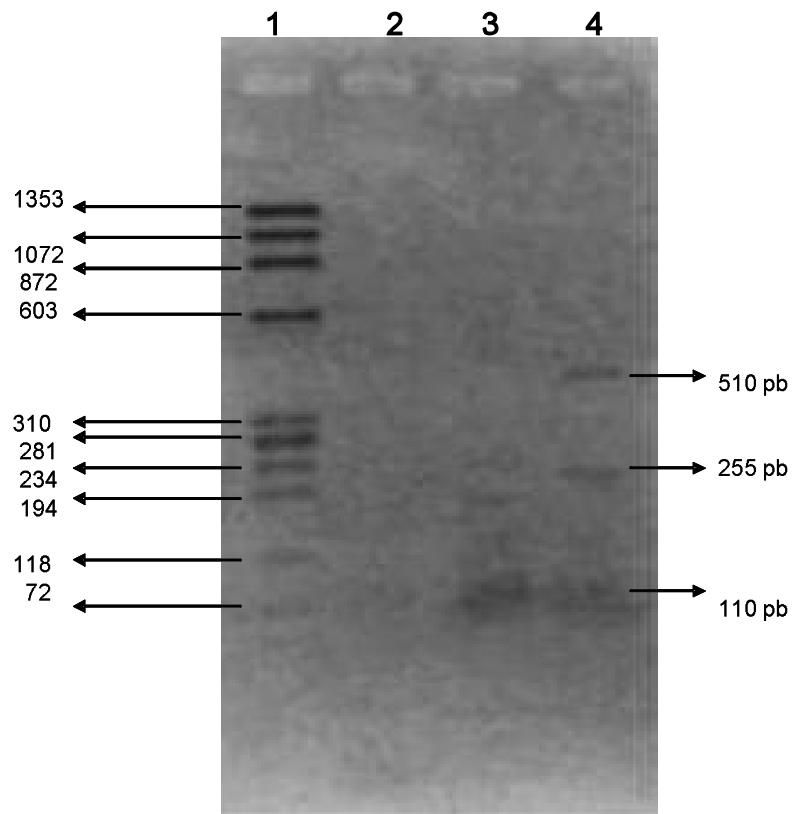
concentraciones de primers de (2.5, 1.25, 0.5 μ M), de las cuales ninguna de estas permitió mejorar los resultados obtenidos con la primera concentración, por lo cual 5 μ M se estableció como concentración de trabajo.

La temperatura de alineamiento de los cebadores fue evaluada teniendo en cuenta la temperatura de fusión de los cebadores 28 SR y 5.8 SF, los cuales contienen 39.1% y 60% de contenido GC respectivamente; esto dio como resultado una temperatura de alineamiento de 52°C, con la cual no se obtuvieron productos de amplificación.

Otros aspectos modificados del protocolo original fueron la concentración de MgCl₂, dNTPs y Taq polimerasa, no obteniéndose mejores resultados por lo cual se continuo con las condiciones utilizadas en el PECET.

La amplificación de la region ITS 2 de *A. nuneztovari*, visualizada en geles de agarosa 2% teñidos con Bromuro de Etidio y utilizando el marcador de peso molecular ϕ x 174, mostro una banda poco definida de aproximadamente 170 pb (Fotografía 16), la cual no correspondia a lo publicado en el Gen Bank donde reportan tres secuencias (371 pb, 377 pb, 369 pb).(Anexo D,E,F).

Estas bandas fueron medidas utilizadon como patrón las secuencias del marcador de peso ϕ x 174 que produce fragmentos desde 72 a 1353 pb.



Fotografía 16. Electroforesis en gel de agarosa 2%. En la línea 1 marcador de peso molecular ϕ x 154, línea 3 amplificación de la región ITS2, línea 4 restricción enzimática de los fragmentos ITS2 de *A. nuneztovari* con la enzima Hae III.

6. DISCUSIÓN

En los mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vector de la malaria, Según Olano y colaboradores⁸, aparecen registrados para Sucre tres especies del subgénero *Nyssorhynchus*: *A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. punctimacula*. Los resultados de este estudio sugieren la presencia de seis especies del género *Anopheles* (*A. albimanus*, *A. nuneztovari*, *A. triannulatus*, *A. marajoara*, *A. aquasalis* y *A. pseudopunctipennis*) de las cuales dos son consideradas como vectores principales de *Plasmodium* para Colombia (*A. albimanus* y *A. nuneztovari*) y una como vector secundario (*A. pseudopunctipennis*).

Anopheles albimanus, reportada por Wiedemann en 1820 a partir de especímenes colectados en Santo Domingo (República Dominicana), fue la primera especie descrita dentro del subgénero (*Nyssorhynchus*) Faran 1980⁴. En Colombia fue hallado en la Costa Atlántica por Lawrence H. Dunn en el año 1929 (Lugar de muestreo no especificado por referencias)³³.

Anopheles nuneztovari descrita por Gabaldon en 1940 a partir de genitales de machos colectados en San Carlos estado Cojedes Venezuela. Los demás estadios fueron descritos por Floch y Abonnenc (1946) y Cova García (1961).

Estudios realizados por Conn et al (1993) describieron tres citotipos o variedades infra-específicas que presentan complemento cromosómico propio pero difieren numérica o estructuralmente del que caracteriza a la especie, para *Anopheles nuneztovari* (complejo *nuneztovari*) con distribución geográfica: citotipo A en la cuenca Amazónica, B en el occidente de Venezuela al sur de la cordillera Andina y C en el occidente de Venezuela al norte de la cordillera y al norte de Colombia³⁴.

Ancpheles nuneztovari hasta el momento es un complejo de especies que sólo pueden ser separadas por marcadores genéticos basados en técnicas citológicas y moleculares. En Colombia fue reportado por primera vez el 11 de agosto de 1930 en Andagoya (Chocó) por White³³.

Ancpheles triannulatus Neiva y Pinto fue descrita por primera vez en 1922 con especímenes recolectados en Fazenda Sao Joao, banco derecho del río Cuiaba (Mato Grosso) Brasil³⁵. Reportado para Colombia por primera vez en Jamundí (Valle) en 1929 por Herting³³.

Ancpheles marajoara fue descrita por Galbao y Damasceno (1942) a partir de larvas, machos y hembras colectados en la isla de Marajó estado de Para Brasil. Por mas de cuarenta años el nombre específico de *A. albirtarsis* fue dado a mosquitos que variaban en morfología, cariotipo, comportamiento.

Por tal motivo las evidencias encontradas en estudios posteriores a diversos niveles, indican que *A. albirtarsis* es un complejo de al menos cuatro especies: *A. albirtarsis* sensu stricto (especie A), que se encuentra en Argentina y sur de Brasil, *A. marajoara* (especie C) que se encuentra distribuida desde Costa Rica hasta Bolivia, *A. deaneorum* (especie D)³⁶ presenta una distribución limitada a los estados de Rondonia y Mato Grosso Brasil y Argentina, y una cuarta especie(especie B) aun no descrita morfológicamente que presenta una amplia distribución en Brasil extendiéndose hasta Paraguay.³⁴ En Colombia fue descrito por primera vez en Buga por Herting 1928 como *A. albirtarsis*³³.

Ancpheles pseudopunctipennis fue descrito por Theobald en 1901 quien colectó especímenes en la isla de Grenada en las Antillas Menores³⁷. Fue reportado para Colombia por Herting cerca a Palmira, Valle en el año 1929³³. Es uno de los vectores con mayor distribución geográfica desde México hasta los países Andinos de Sur América, aunque se encuentra presente desde los Estados Unidos a la parte norte de Argentina a lo largo de los Andes, con una extensión Oriental

en Venezuela y las Antillas Menores, presente en áreas de altitudes sobre los 600 metros. *A. pseudopunctipennis*, actualmente constituye un complejo de dos especies, una especie A de México y una especie B desde los Andes de Perú y Bolivia³⁷.

Las variaciones estacionales con respecto a la captura de Anofelinos en el área de estudio, sugieren que estas poblaciones son mas abundantes en la época de lluvias (de mayo a octubre), lo cual coincide con lo reportado por Brown en 2001³⁸ en un estudio realizado en el estado Trujillo Venezuela donde se señala la disminución de los criaderos temporales relacionada con el aumento de los vientos.

Durante la realización del muestreo en las dos subregiones se encontró que *A. nuneziovari*, *A. triannulatus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. marejoata* y *A. aquasalis* fueron capturados únicamente en el peri domicilio, coincidiendo con estudios realizados en Venezuela (Rubio-Palis y Curtís 1992, Escorza y Villegas)^{40, 39} a diferencia de *Anopheles albimanus* que fue la especie con mayor especimenes capturados en el intra y peri domicilio incluso en horas de la mañana, lo cual coincide con lo reportado por Brown y colaboradores quienes encontraron resultados similares en un estudio realizado en el estado de Trujillo (Venezuela)⁴¹. Además, crea la posibilidad de realizar otras investigaciones con el fin de determinar cual de estas especies actúa como vector de malaria en el departamento de Sucre, teniendo en cuenta la infección natural con el parásito y el grado de antropofilia o grado de ingestión de sangre humana.

A pesar que *A. albimanus* es considerado vector principal de *Plasmodium* y su densidad de captura sobre cebo humano fue mas alta en Morroa que en San Onofre, en los últimos 10 años no se ha presentado un solo caso de malaria en el primero de estos municipios, lo cual podría tener relación con las bajas densidades de capturas de especimenes sobre cebo humano y los resultados

mostrados por Warren et al, quienes reportan que la tasa esporozoítica es generalmente baja; siendo 1.6% la mayor tasa de infección⁴².

Con los datos obtenidos se observa que la distribución de *Ancpheiés* en el departamento es bastante uniforme y simpátrica entre *A. albimanus*, *A. nuneziovari*, *A. triannulatus*, *A. marejoara* y *A. aquasalis* a pesar que el muestreo se realizó en dos subregiones geográficamente diferentes y separadas por un accidente geográfico (Montes de Maria), *Ancpheiés pseudopunctipennis* se encontró en la subregión de la sabana y no en la del golfo de Morrosquillo; resultados semejantes fueron encontrados por Brown y col. En el estudio realizado en ocho poblaciones del estado de Trujillo (Venezuela)³⁸ en el cual se reporta la simpatria entre tres especies del género *Ancpheiés* (*A. albimanus*, *A. danieli* y *A. nuneziovari*).

Nuestros resultados fueron confirmados por investigadores del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la universidad de Antioquia quienes verificaron que la identificación de las especies estuvo sujeta a la descripción de la clave de Faran 1980, con la corrección de que los rasgos evaluados para *A. aquasalis* corresponden a *A. nuneziovari*, teniendo en cuenta aspectos como que *A. aquasalis* no se ha encontrado en Colombia desde la revisión de Faran 1980 y que *A. nuneziovari* está considerado un complejo de tres especies en el cual varían características como la proporción de las medidas de las manchas de tarsómero y de las alas.

En los datos mostrados en la tabla 2 se evidencia que el rango de la medida del tarsómero (Ta III 2), de *A. nuneziovari* (0.33-0.38) se aleja del reportado en la literatura (0.20-0.31)⁴, sin embargo, estos valores al igual que los correspondientes a la mancha clara humeral respecto a la oscura basal y subcostal clara respecto a la subcostal oscura corresponden a lo reportado por Calle D. y colaboradores en el año 2002¹⁶. Teniendo en cuenta lo anterior, estos valores no son suficientes para considerarlos discriminativos; Delgado y Rubio-

Palis demostraron que *A. nuneztovari* posee alta variabilidad morfológica encontrando un rango Ta III 2 de (0.11- 0.44)⁴³, lo que nos hace plantear la posibilidad que los mosquitos identificados como *A. aquasalis* sean realmente *A. nuneztovari*. Este hecho solo puede ser comprobado a través de estudios como series e isofamilias o de técnicas moleculares como PCR, RFLPs, secuenciación y RAPD-PCR^{18,19,44,45}.

En los objetivos iniciales del trabajo se planteó la confirmación por PCR y restricción enzimática de las especies con problemas en su identificación morfológica, pero este objetivo no se cumplió al presentarse problemas en la estandarización del PCR.

Muhammad H y colaboradores en el año 2000, realizaron la optimización de condiciones para PCR como son: la temperatura de alineamiento de los primers, concentración de cloruro de magnesio, de cebadores y de enzima, además de los métodos de tinción de geles de agarosa y poliacrilamida; en la primera variable relacionada con la temperatura recomiendan que se incremente las temperaturas para aumentar la especificidad de los cebadores, modificaron las concentraciones, cantidades muy pequeñas de cebadores fueron limitantes resultando en la formación de muy poco o ningún producto de amplificación; la Taq polimerasa fue mas eficiente de 1 a 10 unidades y niveles muy altos disminuyeron la resolución de las bandas; la concentración optima del MgCl₂ fue de 1Mm concentraciones superiores o inferiores a esta no produjeron resultados⁴⁶; estas recomendaciones se tuvieron en cuenta para la estandarización de del PCR de ITS2 de *Anopheles sp*, pero sin haber podido mejorar las características de la banda, además relacionamos nuestro problema con poca biodisponibilidad de ADN y posibles inhibidores del PCR o las limitaciones en las cantidades de Tag Polimerasa utilizada debido a los altos costos de esta⁴⁷, Descartamos este hecho al realizar extracción de ADN y PCR directamente con una pata de *Anopheles sp*.

CONCLUSIONES

- El departamento de Sucre debería ser considerada una zona de alto riesgo de transmisión de malaria, esto se debe a la presencia de dos especies del género *Anopheles* catalogadas como vectores primario y una como vector secundario, *A. albimanus*, *A. nuneztovari* y *A. pseudopunctipennis* respectivamente.
- La presencia de estos mosquitos con capacidad de transmitir la enfermedad y la cercanía de Sucre con los departamentos de Córdoba y Bolívar; incrementa la posibilidad de epidemias maláricas.
- La mayor tasa de especímenes capturados fue realizado durante la época de lluvias en la región de (mayo a agosto)
- La especie mas abundante durante el periodo de muestreo fue *Anopheles albimanus*, seguido de *A. nuneztovari* y *A. triannulatus*.
- La utilización de claves morfológicas para identificación de *Anopheles* del subgénero *Nyssorhynchus*, resulta útil para evaluar la distribución geográfica de *Anofelinos* en un área vulnerable a la trasmisión malárica.

RECOMENDACIONES

- Para la utilización de claves morfológicas es necesario apoyarse en otro tipo de análisis como son: series, isofamilias y técnicas de biología molecular como RAPD-PCR, RFLP y secuenciación.
- Es necesaria la ejecución de futuros estudios que permitan establecer la tasa de infección, índice de paridad y cuales de las especies presentes en el departamento de Sucre actúan como vectores de malaria.
- Se sugiere la posibilidad de incluir estos resultados en las estrategias de prevención y control elaboradas por el Departamento Administrativo de salud de Sucre (DASSALUD).
- Se recomienda la aplicación de este estudio en otras zonas geográficas del departamento, donde se incluyan el casco urbano de las poblaciones de mayor incidencia de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- 1- BOTERO,D y RESTREPO,M. Parasitosis Humana. Corporación para Investigaciones Biológicas. 3 ed. Medellín. (1998). p. 158-201
- 2- GONZÁLEZ, A *et al.* Situación actual de las enfermedades transmisibles en Colombia y propuesta organizativa Santa Fe De Bogotá. En: Informe quincenal epidemiológico nacional. Vol. 5, No 15. (IQEN 2000); p. 227-230.
- 3- OLANO, Víctor.Situacion epidemiologica de las enfermedades transmitidas por vectores 2003 - 2004 Santa Fe de Bogotá. En: Informe quincenal epidemiológico nacional. Vol. 4, No 8. (2004). Disponible en Internet:
http://www.ins.gov.co/epidemiologia/cce/vsp/2004/2004_sivigila_08.pdf
- 4- OLANO, Víctor. Vigilancia entomológica: un componente de salud pública. Santa Fe de Bogotá. En: Informe quincenal epidemiológico nacional. Vol. 4, No 18. (1999); p. 273-274.
- 5- FARAN, M.E. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae).XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the Subgenus Nyssorhynchus of Anopheles. Contrib. Am. Entomol. Inst. (Ann Arbor). Vol 15, No 7 (1980); p. 1–185.
- 6- LANE, R; CUPP, E; SALOMON, B; y GONZALEZ, R. Manual de entomología medica para investigadores de América Latina.. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Medicas CIDEIM. Cali, Colombia (1999). P. 163 – 204.
- 7- OLIVARES, Manolo. DASSALUD DE SUCRE. Oficina De Epidemiología. Información suministrada de casos autóctonos e importados de malaria, registrados en el departamento de Sucre entre los años 1996-2001.
- 8-CARTER, R; MENDIS,K.N & ROBERTS,D. The biology of malaria parasite. En: Bolletin of the World Health Organization (WHO, Geneve). Vol. 78. No 12 (1987)
- 9- WASSERMAN, Moisés. La dimensión del problema. En: Innovación Ciencias. Vol. VII. No 3 (1998); p. 30- 35.
- 10- OLANO, Victor. Situación de los problemas de malaria en las Américas. En: Boletín Epidemiológico. Vol. 22, No 1(mar,2001)

- 11- OLANO, Víctor etal. Mapas preliminares de la distribución de especies de Anopheles, vectoras del paludismo en Colombia. Santa Fe de Bogotá. Informe quincenal epidemiológico nacional. Vol. 5, No. 22. (2000); p. 342-346
- 12- MENDOZA, N.M etal. Manejo integral de malaria. Santa Fe De Bogota, D.C. (2002). p. 67–68.
- 13- KNIGHT KL & STONE A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). 2 ed. Thomas Say Foundation Entomological Society of América.1977. Citado por: Lane R, Cupp E, Salmón B y González R. Manual de entomología medica para investigadores de América Latina CIDEIM. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Medicas. Cali, Colombia. p.177
- 14- SUAREZ MF, Quiñónez ML, Fleming GA, Robayo M. Guía introductoria a la morfología de Anopheles y clave para la determinación de las principales especies de Colombia. Dirección de campañas directas, Ministerio de Salud de Colombia. Santa Fe de Bogota (1989); p. 30 - 48
- 15- RUBIO-PALIS, Yasmín. Caracterización morfométrica de poblaciones del vector de malaria Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi root (Diptera: Culicidae) en Venezuela. En: Bol. Entomol Venez.Vol.13, No.2 (dic.1998); p.141-172
- 16- CALLE, D.A etal. Morphometric discrimination of females of five species of Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus from southern and north-west Colombia. En: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Vol. 60, No. 3 (2002); p. 364-376
- 17- QUIÑÓNEZ, Marta etal. Variante morfológica de adultos hembras de Anopheles benarrochi (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. En: Revista del Instituto Nacional de Salud. Biomédica. Vol 21, No 4. (dic, 2001); p. 351-9.
- 18- MANGUIN, Sylvie. etal. Population structure of the primary malaria vector in South America, Anopheles darlingi, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. En: Am. J.Trop.Med.Hyg. Vol. 60, No. 3 (1999); p. 364-376
- 19- LOUNIBOS LP etal. Morphological, Molecular, and Chromosomal Discrimination of Criptic Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera, Culicidae) from South America. En: J. Med. Entomol. Vol. 35, No 5. (1998); p. 830-8
- 20- WALTON C. Molecular Identification of Mosquito Species. En: Biological journal of the lannean society. Vol. 68 (1999); p. 241-256. Available online at <http://www.idealibrary.com.on>

- 21- HILL SM, CRAMPTON JM. DNA-based Methods for the Identification of Insect Vectors. En: Annals of tropical medicine and parasitology. Vol. 88, No3 (1994); p. 227-250
- 22- POST RJ, FLOOK PK and WILSON MD. DNA Analysis in Relation to Insect taxonomy, Evolution and Identification. En: Med. Vet. Entomol. Vol.14, No 3; p. 21-34
- 23- SAIKI, R.K etal. Enzymatic Amplification of B-globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sick Cell Anemia. En: Science. Vol. 230 (1998); p.1350-1354
- 24- SMITH, L.M etal. Fluorescence Detection in Automated DNA sequence Analysis. En: Nature. Vol. 321 (1986); p. 674-679
- 25- ONYABE DY and CONN JE. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera:Culicidae). En: Insect molecular biology. Vol.8, No 4.(1999); p.435-442
- 26- MARRELLI MT etal. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *anopheles oswaldoi* (Diptera:Culicidae). En: J.Med.Entomol. Vol. 36, No 6. (1999); p. 679-684
- 27- MALAFRONT RS, MARRELLI MT, and MARINOTTI O. Analysis of ITS2 DNA sequences from brazilian *anopheles darlingi* (Diptera:Culicidae). En: J.Med.Entomol. Vol. 36, No 5. (1999); p. 631-634
- 28- BEARD, CB; HAMM, DM and COLLINS, FH.The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae* : DNA sequence , genome organization and comparison with mitochondrial sequences of other insects. En: Insect Mol Biol. Vol.2 (1993); p. 103-124
- 29- MITCHELL, SE; COCKBURN, AF and SEAWRIGHT, JA. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species a : Complete nucleotide sequence and gene organization genome. Vol. 36 (1993); p.1058-1073
- 30- FARAN, M.E; Linthicum, K.J.. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus)(Diptera:Culicidae). Mosq Syst. Vol.13, No 1. (1981); p. 1–56.
- 31- LINTON, Y.-M etal. Morphological and molecular identity of *Anopheles* (*Cellia*) *sundaicus*(Diptera : Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. En: Syst. Entomol. Vol. 26, (2001) p. 357-366.

- 32- MANIATIS, T; FRITISCH, E and SAMBROOK, J. Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. Vol. 1(1989); p. 1.21-1.30
- 33- GAST, AUGUSTO. Biología y Distribución de los Anophelinos en Colombia. Editorial Cromos Bogota Colombia. (1943); p. 10 – 44.
- 34- RUBIO-PALIS, Yasmín. Anopheles (NYSSORHYNCHUS) DE VENEZUELA TAXONOMIA, BIONOMÍA, ECOLOGÍA E IMPORTANCIA MÉDICA. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental “Dr. Arnoldo Gabaldon” y el Proyecto Control de Enfermedades Endémicas. Maracay, Venezuela. (2000); p. 1-120
- 35 – FERNÁNDEZ, Teresa y LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo. *Anopheles haicphylus*, a New Species of the Subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil . En: Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. Vol. 97, No 6 (Sep, 2002); p. 801-811,
- 36- RUBIO-PALIS, Yasmín; WIKERSON, Richard y GUZMÁN, Hernán. Morphological Character of Adult Anopheles (Nyssorhynchus) Marajoara in Venezuela. En: Journal Of The American Mosquito Control Association.19(2): (2003) p. 107-114
- 37- MANGUIN, Silvie etal. BIOCHEMICAL SYSTEMATICS AND POPULATION GENETIC STRUCTURE OF ANOPHELES PSEUDOPUNCTIPENNIS, VECTOR OF MALARIA IN CENTRAL AND SOUTH AMERICA. En: Am. J. Trop. Med. Hyg.. Vol. 53, No 4 (1995); p. 362-377.
- 38- BROWN, Erick, VILLEGAS, Carlos y ARAUJO, Ramón. Abundancia y diversidad de la fauna anofelina en áreas vulnerables a la transmisión malarica del estado Trujillo, Venezuela. En: BOLETÍN DE MALARIOLOGIA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL. Vol. 51, No 1 y 2 (ene. –dic. 2001); p. 1-10.
- 39- RUBIO-PALIS, Yasmin y CURTIS, C.F. Biting and Resting Behavior of anophelinos in Western Venezuela and implication for control of malaria. En : Med. Vet. Entomol. Vol. 6 (1992a); p. 325-334 Citado por: BROWN, Erick, VILLEGAS, Carlos y ARAUJO, Ramon. Abundancia y diversidad de la fauna anofelina en áreas vulnerables a la transmisión malarica del estado Trujillo, Venezuela. En: BOLETÍN DE MALARIOLOGIA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL. Vol. XLI, No 1 y 2 (ene. –dic. 2001); p. 1-10.
- 40- SCORZA, J. V Y VILLEGAS, E. Importancia de la vigilancia entomologica en la fase de mantenimiento del programa antimalarico. Localidad Agua Caliente, municipio Miranda, estado Trujillo, Venezuela, 1991. En: Bol. Dir. Malariol. San. Amb. Vol. 35 (1995); p. 1-12. Citado por: : BROWN, Erick, VILLEGAS, Carlos y

ARAUJO, Ramon. Abundancia y diversidad de la fauna anofelina en áreas vulnerables a la transmisión malarica del estado Trujillo, Venezuela. En: BOLETÍN DE MALARIOLOGIA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL. Vol. XLI, No 1 y 2 (ene. – dic. 2001); p. 1-10.

41- BROWN, Erick. Estructura etérea en poblaciones naturales de anofelinos, en áreas vulnerables a la transmisión malárica del estado Trujillo, Venezuela. En: BOLETÍN DE MALARIOLOGIA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL. Vol. 43, No 1 (ene. –jul. 2003); p. 45-52.

42- WARREN, McW, MASON, j Y HOBBS, j. Natural infection of *Anopheles albimanus* with Plasmodium in a small malaria focus. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 24. 1995; p. 545-546. Citado por: P. DE MERIDA, Ana Maria etal. MITOCHONDRIAL DNA VARIATION AMONG ANOPHELES ALBIMANUS POPULATIONS. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 61, No. 2 (1999); p. 230-239.

43- NEREIDA, Delgado AND RUBIO-PALIS, Yasmin. IDENTIFICATION OF ANOPHELES (NYSSORHYNCHUS) (DIPTERA: CULICIDAE) OCURRING IN WESTERN VENEZUELA. En: Mosquito Systematics. Vol. 25, No. 3 (1993); p. 222-230.

44- MENDES DOS SANTOS, Joselita Maria. etal. Isoenzymatic Variability among Five Anopheles Species Belonging to the Nyssorhynchus and Anopheles Subgenera of the Amazon Region, Brazil. En: Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 98, No 2, (Mar 2003); p 247-253

45- WILKERSON, Richard C, CAFFIGAN ,Thomas V, LIMA, Jose Bento. Identification of Species Related to Anophe/es (Nyssorhynchus) albitarsis by Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (Diptera: Culicidae). En: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 90, No 6 (Nov.-Dec. 1995); p. 721-732.

46- RANMAN, M. H; JAQUISH, B. Y KHASA, P. D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR® stains. En: plant molecular biology report, Vol. 18. (2000), p. 339 – 348.

47- PORMEGA. Powerplex® 16 Bio System. [Online] Technical manual N° D016. p. 1 – 30. Available from internet: www.promega.com

ANEXO A.
MAPA DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE



ANEXO B.

SECUENCIA ITS2 DE *A. nuneztovari* (LOCUS ANU 92343) CON ENZIMAS DE
RESTRICCIÓN.

Untitled sequence

377 base pairs

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

		Bst71I		
	MnlI	ItaI RsaI		Eam1105I
AciI	MaeI	TthHB8I	BsoFI AfaI	AhdI CviJI
caccgcagaaccaactagcaaggctcgaggctttgctgcgtactgatgatttgattgaccccggtgcagccaagca base pairs				
gtggcgtcttggttgatcggtccagctccgaaacgacgcatgactactaaactaactggggcacagtcggttcgt 1 to 75				
	BfaI	TaqI CviJI Fsp4HI		EclHKI
		BbvI		AspEI
		Csp6I		
	Bsp1286I		TruII	
	ApaLI Bbv12I		Tru9I	HinfI MnlI
	Alw44I Alw21I			
ttgaaggactgtggcgtggtgggtgcaccgagtggtgctgcttaatacgactccctctggtatcacatc base pairs				
aacctcctgacacgcaccaccacgtggctcacacgcacagcaacgaattatgctgaggagaccatagtgtag 76 to 150				
	VneI BmyI DraIII	MseI		PleI
	SduI BsiHKA I			
	AspHI			
BsrBI	BseNI		AspS9I BsoFI	
Cac8I CviJI BsrI			BsiYI Cac8I MaeIII	
GsuI AciI Tsp45I	MwoI SfaNI	CviJI Bsc4I	Cfr13I Pali	
tggagcgggctatccagtcacaatcccagcgaaatgtgcattacgggtagcccgatgtggcgggcccggaa base pairs				
acctcgccgataggctcagtggttaggggtcgctttacacgtagatgcccatcggggtacacgcggcgccctt 151 to 225				
BpmI FauI MaeIII			BslI Sau96I BsuRI	
AccBSI BsrSI			AsuI FauI	
BstD102I BseI			AciI CviJI	
ItaI MvnI KspI AciI MvnI Bme18I AciI MnlI MaeIII			MaeII	
DsaI BstUI SstII HinfI Bsh1236I AspS9I CviJI			Eco3LI	
BsaJI AccII Sfr303I ThaI SinI AsuI PspN4I AluI			Alw26I RsaI	
tcgcgacccctccctcaaagccagctcatgtgacaccaaatac caaaagagagagagagagagaccaaagctacc base pairs				
agcgccctggaggaggagtttcggtcgagtacactgtggtttatggttttctctctctctctctctggtttgcatgg 226 to 300				
BstDSI MspALI SacII BstUI HgiEI Eco47I Cac8I Hsp92II			BsmAI Csp6I	
Fsp4HI ThaI Bsh1236I TfiI Cfr13I AvaII MnlI Tsp45I			BsaI AfaI	
BseDI Nsp8II Cfr42I AccII Sau96I NlaIV CviJI NlaIII				
HspAI AviII Fsp4HI BstUI NdeII			NdeII SpeI	
HinPII CfoI BssSI BsqI AccII DpnII DpnI			AfaI K209I MaeI	
Eco57I BstF5I HhaI BsiI CviJI ThaI Bsh1236I			Csp6I Sau3AI BfaI	
ctgaagcaacggatgcgcacacgagtggtgcagctcatcgcatcagtaagagagagagagataccgatcactagtg base pairs				
gacttcgttgctacgcgtgtgctcacacgtcgagtagcgctagtcattctctctctctctctcatggctagtgatcac 301 to 375				
MwoI FspI AsplEI BsoFI Bst71I NruI Bsp143I			RsaI Bsp143I	
FokI SfaNI MslI AluI Bsp68I Sau3AI			DpnII AcLI	
Hin6I Acc16I ItaI BbvI MvnI MboI K209I			MboI DpnI	

ANEXO C SECUENCIA ITS2 DE *A. aquasalis* CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Untitled sequence

352 base pairs

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

```

                                     Bst71I
                                     MnlI  ItaI  RsaI
                                     MwoI
AcII  MaeI  TthHB6I  BsoFI  AfaI
caccgcagaaccaactagcaaggtcgaggctttgctgcgtactgatgatttgattgaccccgtagcaatcaagca base pairs
gtggcgctcttggttgatcgttccagctccgaacgacgcgatgactactaaactaaactggggcacgggtagtctcg 1 to 75
                                     BfaI  TaqI  CviII  Fsp4HI
                                     BbvI
                                     Csp6I
                                     Bsp1286I  BstUI
                                     ApaI  Bbv12I  AccII  MseI
                                     Alw44I  Alw21I  ThaI  Tru9I  HinfI  MnlI
ttgaaggactgtggcggtgggtgggtgcaccgtgtgtgtcgcgttgcttaatacgcactccctctggtatcacatctg base pairs
aacttctcgacaccgcaccaccacgtggcacacacagcgcaacgaattatgctgaggagaccatagtgtagac 76 to 150
                                     VneI  BmyI  DraIII  Bsh1236I  PleI
                                     SduI  BsiHKA1  TruII
                                     AspHI  MvnI
                                     BsrBI  BseNI
                                     Cac8I  CviII  BsrI
                                     GsuI  AciI  Tsp45I
gagcgggctatccagtcacaatccccagcgaatgtgcagctaaggtagccccgatgtggaggaccatgctctc base pairs
ctcgcgggataggtcagtggttaggggtcgctttacacgtcgattccatcggggctacacctcctggtacgaggag 151 to 225
                                     BpmI  FauI  MaeIII
                                     AccBSI  BsrSI
                                     BstD102I  BseII
                                     BsoFI  BbvI  CviII  BslI  SinI  AvaII
                                     ItaI  DdeI
                                     BsgI
                                     Sau96I  Hsp92II
                                     AsuI  Eco47I
                                     Hsp92II
MnlI  BseII
MnlI  BsrSI
cctcaacgccagtcctatgtgatacacaccaaacggagcgcgagagatgaaaaacgtaccctgaagcaacgtgtgcgc base pairs
ggagttgcgggtcaggtacactatgtgtggtttgcctcgctctctactttttgcatgggacttcgttgacacgcgc 226 to 300
BseRI  BseNI
                                     BsrI  NlaIII
                                     RsaI
                                     MaeII
                                     Csp6I
                                     AfaI
                                     BssHII
                                     AflIII  Hin6I
                                     Eco57I  HinfII
                                     MaeII  HspAI
                                     MwoI  HhaI
                                     BsePI
                                     AspLEI  HhaI
                                     BstUI  Hin6I  MaeIII
                                     Cac8I  HspAI  CfoI
                                     Bpu1102I  Bsp1286I  BanII  BsiI  Bsp143I
                                     AluI  CelII  BmyI  SacI  SstI  BssSI  K209I
                                     Ec1136II  SduI  Bbv12I  Alw21I  DpnII  DpnI
gcgcacgggtgtaactctgcttgagctcagctcgtgaacgagatcaagtggtg base pairs
cgcgtgccacattgagacgaa ctcgagtcgagcacttgctctagttcaccc 301 to 352
                                     ThaI  CfoI  AspLEI
                                     CviII  B1pI  AspHI  FrlOI  CviII  NdeII
                                     MvnI  Bsh1236I
                                     EcoICRI  BstDEI  Eco24I  BsiHKA1  Sau3AI
                                     AccII  HinfII
                                     DdeI  Bsp1720I  Psp1248I  AluI  MboI

```

ANEXO D

SECUENCIA COMPLETA ITS2 DE *A. nuneztovari* (LOCUS ANU 92351)

```

LOCUS       ANU92351                  371 bp    DNA    linear    INV 03-JUN-1997
DEFINITION  Anopheles nuneztovari internal transcribed spacer 2, complete
            sequence.
ACCESSION   U92351
VERSION     U92351.1  GI:2149675
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles nuneztovari
  ORGANISM  Anopheles nuneztovari
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1 (bases 1 to 371)
  AUTHORS   Danoff-Burg,J.A. and Conn,J.E.
  TITLE     Character congruence in Anopheles mosquito phylogenetics
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 371)
  AUTHORS   Danoff-Burg,J.A. and Conn,J.E.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-MAR-1997) Entomology, American Museum of Natural
            History, Central Park West, 79th Street, New York City, NY 10024,
            USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..371
                     /organism="Anopheles nuneztovari"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:30067"
     misc_RNA       1..371
                     /note="internal transcribed spacer 2; ITS2; flanked by
                     5.8S and 28S rRNA genes"
ORIGIN
      1 caccgcagaa ccaactagca aggtcgaggc ttgtctgcgt actgatgatt tgattgaccc
      61 cgtgtcagcc aagcattgaa ggactgtggc gtggtgggtg caccgagtgt gcgtgtcggt
     121 gcttaatacg actccctctg gtatcacatc tggagcgggc tatccagtca caatccccag
     181 cgaaatgtgc atctacgggt agccccgatg tggcggggcc cggaatcgcg gaccctccct
     241 caaagccagc tcatgtgaca ccaaatacca aaagagagag agaccaaacg taccctgaag
     301 caacggatgc gcacacgagt gtgcagctca tcgcgatcag taagagagag agagtaccga
     361 tcactagtgg g
//

```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

ANEXO E

SECUENCIA COMPLETA ITS2 DE *A. nuneztovari* (LOCUS ANU 92343)

LOCUS ANU92343 377 bp DNA linear INV 03-JUN-1997
 DEFINITION Anopheles nuneztovari internal transcribed spacer 2, complete sequence.
 ACCESSION U92343
 VERSION U92343.1 GI:2149667
 KEYWORDS .
 SOURCE Anopheles nuneztovari
 ORGANISM [Anopheles nuneztovari](#)
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea; Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 377)
 AUTHORS Danoff-Burg, J.A. and Conn, J.E.
 TITLE Character congruence in Anopheles mosquito phylogenetics
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 377)
 AUTHORS Danoff-Burg, J.A. and Conn, J.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-MAR-1997) Entomology, American Museum of Natural History, Central Park West, 79th Street, New York City, NY 10024, USA
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..377
 /organism="Anopheles nuneztovari"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:30067"
[misc_RNA](#) 1..377
 /note="internal transcribed spacer 2; ITS2; flanked by 5.8S and 28S rRNA genes"
 ORIGIN
 1 caccgcagaa ccaactagca aggtcgaggc tttgctgcgt actgatgatt tgattgaccc
 61 cgtgtcagcc aagcattgaa ggactgtggc gtggtgggtg caccgagtgt gcgtgtcgtt
 121 gcttaatacg actccctctg gtatcacatc tggagcgggc tatccagtca caatccccag
 181 cgaaatgtgc atctacgggt agccccgatg tggcggggccg cggaatcgcg gaccctccct
 241 caaagccagc tcatgtgaca ccaaatacca aaagagagag agagagagac caaacgtacc
 301 ctgaagcaac ggatgcgcac acgagtgtgc agctcatcgc gatcagtaag agagagagag
 361 taccgatcac tagtggg

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

ANEXO F

SECUENCIA COMPLETA ITS2 DE *A. nuneztovari* (LOCUS ANU 92350)

```

LOCUS       ANU92350                  369 bp    DNA     linear   INV 03-JUN-1997
DEFINITION  Anopheles nuneztovari internal transcribed spacer 2, complete
            sequence.
ACCESSION   U92350
VERSION     U92350.1  GI:2149674
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles nuneztovari
  ORGANISM  Anopheles nuneztovari
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1 (bases 1 to 369)
  AUTHORS   Danoff-Burg,J.A. and Conn,J.E.
  TITLE     Character congruence in Anopheles mosquito phylogenetics
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 369)
  AUTHORS   Danoff-Burg,J.A. and Conn,J.E.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-MAR-1997) Entomology, American Museum of Natural
            History, Central Park West, 79th Street, New York City, NY 10024,
            USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..369
                     /organism="Anopheles nuneztovari"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:30067"
     misc_RNA        1..369
                     /note="internal transcribed spacer 2; ITS2; flanked by
                     5.8S and 28S rRNA genes"
ORIGIN
1  caccgcagaa ccaactagca aggtcgaggc ttgctgcgt actgatgatt tgattgaccc
61  cgtgtcagcc aagcattgaa ggactgtggc gtggtgggtg caccgagtgt gcgtgtcgtt
121  gcttaatacg actccctctg gtatcacatc tggagcgggc tatccagtca caatccccag
181  cgaaatgtgc atctacgggt agccccgatg tggcgggccg cggaatcgcg gaccctccct
241  caaagccagc tcatgtgaca ccaaatacca aaagagagag accaaacgta cctgaagca
301  acggatgcgc acacgagtgt gcagtcacgc gcgatcagta agagagagag agtaccgatc
361  actagtggg

//

```