

Biomédica 2013;33:42-52
doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i1.619>

ARTÍCULO ORIGINAL

Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con *Plasmodium*

Lorena I. Orjuela¹, Manuela Herrera¹, Holmes Erazo², Martha L. Quiñones¹

¹ Departamento de Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento Administrativo de Salud de Putumayo, DASALUD, Mocoa, Colombia

Trabajo realizado en el Laboratorio de Entomología Médica, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Introducción. El departamento del Putumayo es una región endémica para malaria, o paludismo, causada principalmente por *Plasmodium vivax*. Los vectores en esta región incluyen *Anopheles darlingi*, el cual se ha encontrado solamente en el municipio de Puerto Leguizamó, y recientemente se incriminaron como vectores en Puerto Asís a las especies *An. rangeli* y *An. oswaldoi*.

Objetivo. El propósito del trabajo fue determinar el papel de *An. benarrochi* B en la transmisión de malaria en este departamento, ya que se reporta como la especie más abundante que pica a los humanos.

Materiales y métodos. Se recolectaron larvas y adultos de *Anopheles* spp. entre el 2006 y el 2008 en los municipios Puerto Leguizamó y Puerto Asís, y se obtuvieron secuencias del gen *ITS-2* y del gen mitocondrial *COI* para confirmar las determinaciones taxonómicas por morfología. Se practicó la prueba ELISA para establecer la infección por *P. vivax* y *P. falciparum*.

Resultados. Se identificaron 6.238 individuos correspondientes a 11 especies: *An. albitarsis* s.l. (1,83 %), *An. benarrochi* B (72,35 %), *An. braziliensis* (0,05 %), *An. costai* (0,06 %), *An. darlingi* (19,37 %), *An. mattogrossensis* (0,08 %), *An. neomaculipalpus* (0,13 %), *An. oswaldoi* s.l. (0,64 %), *An. punctimacula* (0,03 %), *An. rangeli* (5,12 %) y *An. triannulatus* s.l. (0,34 %). Se evaluaron 5.038 adultos por ELISA y 5 se encontraron positivos para *P. vivax* 210 y VK 247, todos pertenecientes a la especie *An. benarrochi* B.

Conclusión. Los resultados sugieren que *An. benarrochi* B juega un papel en la transmisión de *P. vivax* en el departamento de Putumayo, dada su alta atracción por los humanos y su infección natural con *Plasmodium* spp.

Palabras clave: malaria, paludismo insectos vectores, *Anopheles*, Colombia

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i1.619>

Anopheles species present in the department of Putumayo and their natural infectivity with *Plasmodium*

Introduction: Putumayo is considered an endemic region for malaria transmission, mainly due to *Plasmodium vivax*. The vectors in this region are *Anopheles darlingi*, which has been found only in the municipality of Puerto Leguizamó, and *An. rangeli* and *An. oswaldoi* s.l., which were recently incriminated as vectors in Puerto Asís.

Objective: The purpose of this study was to determine the role of *An. benarrochi* B in malaria transmission in Putumayo, given that it is the most abundant species biting humans.

Materials and methods: Collections of immature and adult stages of *Anopheles* spp. were made between 2006 and 2008 in the municipalities of Puerto Leguizamó and Puerto Asís in Putumayo, and sequences of internal transcribed spacer 2 (*ITS-2*) of ribosomal DNA and the mitochondrial gene *COI* were obtained to confirm the morphological determinations. ELISA was carried out for *P. vivax* and *P. falciparum* infectivity.

Results: A total of 6,238 specimens were identified, distributed in 11 species: *An. albitarsis* s.l. (1.83%), *An. benarrochi* B (72.35%), *An. braziliensis* (0.05%), *An. costai* (0.06%), *An. darlingi* (19.37%), *An. mattogrossensis* (0.08%), *An. neomaculipalpus* (0.13%), *An. oswaldoi* s.l. (0.64%), *An. punctimacula*

Contribución de los autores:

Lorena I. Orjuela participó en el trabajo de laboratorio, análisis de datos, revisión de resultados y elaboración del manuscrito. Manuela Herrera hizo la secuenciación de *ITS-2* y *COI* de los especímenes.

Holmes Erazo recolectó los especímenes en campo, y apoyó la clasificación en series e isofamilias.

Martha L. Quiñones orientó el trabajo en campo y laboratorio, participó en el análisis de datos, en la revisión de resultados y en la elaboración del manuscrito.

(0.03%), *An. rangeli* (5.12%), and *An. triannulatus s.l.* (0.34%). A total of 5,038 adults were assessed by ELISA and 5 were found positive for *P. vivax* 210 and VK 247, all belonging to *An. benarrochi* B.

Conclusion: The results suggest that *An. benarrochi* B plays a role in the transmission of *P. vivax* in Putumayo due to its high human contact and natural infection with *Plasmodium* sp.

Key words: malaria, insect vectors, *Anopheles*, Colombia

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i1.619>

En Colombia anualmente se han registrado en promedio 140.000 casos de malaria, o paludismo, en la última década (1), 70 % de los cuales son causados por *Plasmodium vivax* y el resto casi exclusivamente por *P. falciparum* (2).

En el departamento de Putumayo se registra anualmente un promedio de 3.800 casos de malaria, y *P. vivax* es la especie predominante con 95,70 %. Los municipios Puerto Asís y Puerto Leguízamo aportan el 50 % de los casos del departamento, siendo el primero el de mayor reporte, con un promedio de 610 casos al año en la última década. En este municipio, el 98,4 % de los casos los causa *P. vivax* y, solamente el 1,6 %, *P. falciparum*, mientras que en Puerto Leguízamo se reporta un número mayor de casos por *P. falciparum* (12 %) (3).

El índice parasitario anual del departamento presentó un incremento importante entre los años 2000 y 2007, con cifras que están entre 1,76 y 8,27. En este mismo periodo, los índices parasitarios anuales en los municipios de Puerto Leguízamo y Puerto Asís oscilaron entre 0,13 a 43,06 y 0,11 a 21,4, respectivamente. De acuerdo con estos datos, en el 2007, cuando se desarrolló la mayor parte del presente trabajo, los dos municipios se catalogaron como áreas de alto riesgo (4).

Un estudio anterior para determinar las especies de *Anopheles* presentes en el departamento de Putumayo, incluyó colecciones de estadios inmaduros y adultos de los municipios Puerto Asís, San Miguel y Puerto Leguízamo (5). Los resultados de las identificaciones por morfología de todos los estadios asociados, reportaron la presencia de 14 especies de *Anopheles*, entre las que se encontraron, de mayor a menor proporción, las siguientes que picaban a los humanos: una nueva especie designada como *An. benarrochi* B, por

describir (6), *An. rangeli* Gabaldon, Cova Garcia & López, *An. oswaldoi* Peryassu, *An. triannulatus* Neiva & Pinto, *An. costai* Fonseca & Ramos, *An. braziliensis* Chagas, *An. marajoara* Galvao & Damasceno, *An. apicimacula* Dyar & Knab, *An. strodei* Root, *An. peryassui* Dyar & Knab, *An. darlingi* Root, *An. punctimacula* Dyar & Knab, *An. neomaculipalpus* Curry y *An. mattogrossensis* Lutz & Neiva.

De estas especies solo *An. darlingi* se considera vector principal de malaria para el país (7). *Anopheles darlingi* se encontró únicamente en Puerto Leguízamo, en los límites entre los departamentos de Putumayo y Amazonas, donde es considerada la especie responsable de mantener la transmisión de paludismo (5). Quiñones, *et al.* (5), evaluaron por ELISA 29 individuos pertenecientes a esta especie, pero ninguno resultó positivo para la proteína del circumsporozoito de *Plasmodium* spp., posiblemente por el escaso número de especímenes probados. Además, en ese estudio se evaluaron 413 especímenes identificados como *An. rangeli* y 362 como *An. oswaldoi s.l.*, de los cuales, 36 fueron positivos a la variante 210 de *P. vivax* (35 *An. rangeli* y 1 *An. oswaldoi*), para un porcentaje de positivos de 8,19 % y 4,35 %, respectivamente. Debido a estos resultados, las especies *An. rangeli* y *An. oswaldoi s.l.* fueron incriminadas como vectores naturales de malaria humana en Putumayo (5).

Durante ese mismo estudio, la especie que pica a los humanos recolectada en mayor proporción (66,10 %) fue *An. benarrochi* B. Sin embargo, ninguno de estos especímenes se encontró positivo para *P. falciparum* o *P. vivax* por ELISA. Estos resultados contrastan con los obtenidos en Perú por Flores, *et al.* (8), donde *An. benarrochi s.l.* se encontró naturalmente infectado con *P. falciparum* y *P. vivax* en un estudio en el que se evaluaron 62.941 especímenes pertenecientes a esta especie. De acuerdo con los reportes de Quiñones, *et al.* (5), y Fernández, *et al.* (9), *An. benarrochi* B encontrado en Putumayo es morfológicamente similar a los individuos identificados como *An. benarrochi s.l.* en Perú y que son considerados

Correspondencia:

Martha L. Quiñones, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 316 5000, extensión 15078
mlquinonesp@unal.edu.co

Recibido: 15/12/11; aceptado:14/08/12

vectores en los estados de Loreto y Ucayali en límites con Putumayo.

Otras especies, como *An. oswaldoi*, *An. punctimacula*, *An. neomaculipalpus*, *An. triannulatus* y *An. marajoara*, también registradas para el departamento, se han encontrado naturalmente infectadas con especies de *Plasmodium* (5, 8, 10-15) y, en algunos casos, se han involucrado en la transmisión del paludismo en el país o en los países que comparten frontera con Colombia, como Perú, Venezuela y Brasil. La importancia de estas especies en la transmisión de malaria en los municipios de Puerto Leguizamo y Puerto Asís del departamento de Putumayo, no se conoce.

Varias de las especies reportadas en el Putumayo pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus*. Este subgénero contiene la mayoría de las especies de *Anopheles* incriminadas como vectores en Latinoamérica y es el subgénero que más dificultades presenta para la determinación taxonómica cuando se utiliza la morfología de las hembras adultas (16), estadio que se recolecta normalmente durante la vigilancia epidemiológica regular que realizan las secretarías de salud. Además, varias de estas especies son miembros de complejos de especies, como es el caso de *An. oswaldoi* (Ruiz F, Herrera M, Sallum M, Motoki M, Wilkerson R, Ponsonby D, *et al.* (2008) Molecular systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) in South America. In: The 16th European Society for Vector Ecology Conference, 25 - 28 March 2008, Fitzwilliam College, Cambridge) *An. marajoara* (17) y *An. triannulatus* (18), lo cual dificulta aún más su determinación taxonómica.

Un ejemplo que ilustra el problema de la identificación por morfología de las hembras adultas en el departamento de Putumayo es el de *An. benarrochi* B. Esta especie fue erróneamente identificada como *An. evansae* Bretes y, posiblemente, como *An. oswaldoi* (19-21), debido a la variabilidad morfológica que presenta en características normalmente usadas en la diferenciación de estas especies (16, 22-24). La identidad de la especie *An. benarrochi* pudo esclarecerse principalmente con la morfología de los huevos (21) y la morfología del *aedeago* de los machos, y se describió como una variante morfológica de *An. benarrochi* (19). Posteriormente, con base en la morfología de los genitales masculinos y con el análisis de secuencias de la región *ITS-2* y *COI*, se identificó como una especie diferente, denominada *An. benarrochi* B (6).

Estas dificultades para la determinación taxonómica de especies de *Anopheles*, al utilizar adultos hembra, obstaculizan los estudios sobre su biología y papel como vectores, información útil para la implementación de la vigilancia entomológica y la selección de estrategias de control efectivas y su evaluación, por lo que se hace necesario esclarecer la identidad de las especies de *Anopheles* presentes, así como su papel como vectores en un área determinada.

El propósito del trabajo fue determinar el papel de *An. benarrochi* B en la transmisión de malaria en este departamento, ya que se reporta como la especie de mayor abundancia que pica a los humanos.

Materiales y métodos

Los municipios seleccionados para la recolección de mosquitos fueron Puerto Leguizamo, en las localidades La Quebradita (74°40'40.5"W - 0°19'2.4"N), La Concepción (75°51'2"W - 08°11'04"N), Puntales (74°29'21.5"W - 0°27'12.1"N) y El Tablero (75°56'38.7"W - 0°13'4.4"N), y Puerto Asís, en la localidad La Manuela (76°32'2"W - 0°20'2"N). Los especímenes fueron recolectados por funcionarios del Grupo de Entomología del Departamento Administrativo de Salud, DASALUD (Putumayo), entre noviembre de 2006 y abril de 2008. Se capturaron estadios inmaduros y de adultos de *Anopheles* spp.

Se hizo una búsqueda en las horas de la mañana, de criaderos existentes alrededor de las viviendas. En cada uno de ellos se recolectaron larvas de tercer y cuarto estadio, siguiendo el método del cucharón mediante 10 "cucharonadas" por cada metro cuadrado de superficie, según la metodología de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (25).

Las larvas se mantuvieron vivas individualmente hasta que completaron su desarrollo hasta adulto; de esta forma, se obtuvieron la exuvia de la larva, la pupa y el adulto del mismo ejemplar. Las exuvias se preservaron en viales de 0,5 ml con alcohol al 70 % y los adultos se empacaron en el mismo tipo de vial con la tapa perforada, un ejemplar por vial, y estos, en bolsas de cierre hermético con sílica gel. Este material se transportó al Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, donde se hicieron los montajes de las pieles de los inmaduros, y de las alas y patas de las hembras, siguiendo la metodología propuesta por González y Carrejo (24).

Los mosquitos adultos hembra se recolectaron sobre humanos con aspiradores bucales, en el peridomicilio y el intradomicilio, entre las 18:00 y las 21:00 y, en algunos casos (cuando la situación de orden público lo permitió), entre las 18:00 y las 06:00. En cada una de las casas trabajaron simultáneamente cuatro personas, dos en el intradomicilio y dos en el peridomicilio. Los recolectores cambiaban de sitio cada hora, para equilibrar el posible sesgo debido a diferencias en atracción y habilidad del personal para las capturas. Cada sitio de muestreo se visitó durante dos a seis días, según las actividades regulares de vigilancia en malaria por parte de los funcionarios de entomología del departamento.

Los mosquitos se guardaron individualmente en viales Eppendorf de 0,5 ml con la tapa perforada y se almacenaron en bolsas con sílica gel, separados según la hora de recolección, la fecha y el sitio de captura. Además, se recolectaron mosquitos del rededor del ganado vacuno en pastoreo, entre las 20:00 y 22:00, durante una semana en agosto de 2007, en dos viviendas de la localidad La Manuela del municipio de Puerto Asís. Estos ejemplares se procesaron de la misma forma que los provenientes de recolecciones con atrayente humano.

Los mosquitos adultos hembra y los ejemplares procedentes de formas inmaduras, junto con sus estadios asociados, se identificaron usando las claves taxonómicas de Faran (16), Faran y Linthicum (22), Suárez, *et al.* (23), y González y Carrejo (24).

Una muestra de cada especie se seleccionó para secuenciar la región del segundo espaciador transcrito interno (*ITS-2*) del genoma nuclear, el cual se amplificó usando los cebadores dirigidos contra una secuencia conservada de los genes *5.8S* y *28S* descritos por Li y Wilkerson (17), y el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (*COI*), usando dos conjuntos de cebadores conservados descritos por Lehr, *et al.* (26). En algunos casos, las muestras provenían de familias establecidas en el laboratorio y determinadas por morfología de todos los estadios asociados; en otros, provenían de las recolecciones hechas con atrayente humano e identificadas por la morfología de las hembras adultas.

A los mosquitos adultos secos, se les extrajo el ADN con el kit de extracción de *DNAeasy™ Blood and Tissue Kit* de Qiagen. Para la amplificación por PCR del *ITS-2* y de *COI* se siguieron la

metodologías propuestas por Ruiz, *et al.* (6), y por Lehr, *et al.* (26), respectivamente. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %. Los productos se secuenciaron en ambas direcciones usando los dos iniciadores (*primers*), directo e inverso. La secuenciación se hizo en el *Wadsworth Center Molecular Genetics* del *New York Health Department*. Las secuencias se revisaron y editaron con el programa Sequencher 3.0™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA), se alinearon y se logró el consenso entre la secuencia directa y la inversa.

Una vez editadas las secuencias, se compararon con las disponibles en el banco de secuencias *GenBank*, utilizando BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), disponible en línea en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), con el fin de esclarecer las identificaciones morfológicas, con base en los porcentajes de identidad.

PCR-RFLP: los mosquitos adultos hembra identificados morfológicamente como *An. benarrochi* B o *An. oswaldoi*, fueron procesados por PCR-RFLP para el espaciador transcrito intergénico 2 (*ITS-2*), siguiendo la metodología propuesta por Ruiz, *et al.* (6). Para la RFLP se utilizó la enzima Hae III (Promega™) como endonucleasa de restricción, la cual permitió diferenciar *An. benarrochi* B de *An. oswaldoi*, obteniendo un patrón de bandas característico para cada una de las especies. El sitio de corte de esta enzima es 5'...GG/CC...3' y 3'...CC/GG...5'.

La determinación de la infección natural con *Plasmodium* spp. se hizo usando la técnica inmunológica ELISA propuesta por Wirtz, *et al.* (27-29), siguiendo la metodología estándar del protocolo de estuches de ELISA, distribuidos por los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), utilizando los anticuerpos monoclonales de *P. vivax*, VK210 y VK 247, y de *P. falciparum*.

A cada mosquito identificado se le separó cuidadosamente la cabeza y el tórax del abdomen, para evitar la posibilidad de obtener falsos positivos por presentar ooquistes en el estómago. Similarmente, se removieron las alas y las patas, tratando de evitar la detección de la proteína del circunsporozoíto circulante en la hemolinfa y para disponer de estas partes en la identificación de la especie por morfología y métodos moleculares. Todos los mosquitos, excepto los identificados como *An. darlingi*, fueron examinados individualmente mediante ELISA; *An. darlingi* fue examinado en grupos de cinco o menos mosquitos. Los grupos

consistieron en mosquitos recolectados en la misma fecha y a la misma hora, en el mismo sitio de captura. Los resultados se leyeron en un lector de ELISA con filtro de 405 nm, después de 30 minutos o una hora. Como punto de corte se usó el doble del promedio de los negativos, el cual ha sido encontrado como el más confiable en evaluaciones de campo (30). Los individuos positivos en una primera ELISA, se confirmaron en una segunda ELISA.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Se obtuvo consentimiento informado por escrito de los participantes en la metodología propuesta para la recolección de mosquitos sobre atrayente humano. Las personas involucradas fueron técnicos con experiencia del Grupo de Entomología de DASALUD, Putumayo, quienes participaron voluntariamente en el estudio y quienes previamente conocían el protocolo de la Organización Mundial de la Salud para las recolecciones de mosquitos *Anopheles*.

Resultados

Determinación taxonómica de las especies

Se encontraron tres criaderos permanentes y naturales, uno en la localidad La Concepción, Puerto Leguízamo, y dos en La Manuela, Puerto Asís, en julio y agosto de 2007. Los tres criaderos fueron expuestos al sol y con vegetación emergente. Se realizaron 246 series a partir de las larvas recolectadas en estos criaderos y se identificaron cuatro especies: *An. rangeli* (n=105), *An. triannulatus s.l.* (n=72), *An. albitarsis s.l.* (n=60) y *An. braziliensis* (n=9).

En las capturas de mosquitos adultos se identificaron 11 especies en 6.238 hembras adultas recolectadas. Del total de hembras adultas, 5.770 fueron recolectadas con atrayente humano y, 468, en reposo animal. La especie de *Anopheles* más frecuente en las recolecciones con atrayente humano fue *An. benarrochi* B (4.470 individuos, que corresponden al 77,47 % del total de mosquitos identificados), seguida por *An. darlingi* con 1.208 (20,94 %). Otras especies determinadas en menor proporción fueron *An. rangeli* (0,31 %), *An. albitarsis s.l.* (0,43 %), *An. oswaldoi s.l.* (0,40 %), *An. triannulatus s.l.* (0,17 %), *An. neomaculipalpus* (0,09 %), *An. mattogrossensis* (0,09 %), *An. costai* (0,07 %) y *An. punctimacula* (0,03 %). En el cuadro 1 se presenta el total de *Anopheles* recolectados por localidad y por sitio de captura, en cada uno de los municipios muestreados.

En abrigo animal, las especies recolectadas en mayor proporción fueron *An. rangeli* (64,53 %), *An. albitarsis s.l.* (19,02 %) y *An. benarrochi* B (9,19 %), y en menor proporción, se encontraron *An. triannulatus s.l.*, *An. braziliensis*, *An. neomaculipalpus* y *An. oswaldoi s.l.*, aportando tan solo el 7,26 % (cuadro 2).

La especie *An. benarrochi* B se evidenció como muy antropofílica, además de ser tanto endofágica como exofágica, a diferencia de las especies *An. rangeli* y *An. albitarsis s.l.*, las cuales mostraron un acentuado comportamiento zoofílico.

Se obtuvieron 54 familias a partir de 200 hembras que se recolectaron en La Manuela, Puerto Asís, las cuales fueron determinadas taxonómicamente por morfología de huevos, de larvas y de adultos

Cuadro 1. Especies de *Anopheles* presentes en las localidades de Puerto Leguízamo y P. Asís, Putumayo, recolectadas con atrayente humano entre las 18:00 y las 21:00 horas, de noviembre de 2006 a agosto de 2007

Municipio Especies	Puerto Leguízamo								Puerto Asís		Total	%
	La Quebradita		La Concepción		Puntales		El Tablero		La Manuela			
	Intra	Peri	Intra	Peri	Intra	Peri	Intra	Peri	Intra	Peri		
<i>An. benarrochi</i> B	7	8	602	1288			179	875	726	785	4.470	77,47
<i>An. darlingi</i>	217	973			3	13					1.206	20,90
<i>An. oswaldoi s.l.</i>		1		4	1	9	1	5		2	23	0,40
<i>An. rangeli</i>			1	1				4	3	9	18	0,31
<i>An. albitarsis s.l.</i>		1		5					11	10	27	0,47
<i>An. mattogrossensis</i>			2	2				1			5	0,09
<i>An. costai</i>				1				3			4	0,07
<i>An. triannulatus</i>			1	1				1	3	4	10	0,17
<i>An. punctimacula</i>		1								1	2	0,03
<i>An. neomaculipalpus</i>									1	4	5	0,09
Total	1.208		1.908		26		1.069		1.559		5.770	100,00

Intra: intradomicilio; peri: peridomicilio

Cuadro 2. Especies de *Anopheles* presentes en La Manuela, Puerto Asís, recolectadas en abrigo animal, en agosto de 2007

Especies	Número de mosquitos recolectados	%
<i>An. rangeli</i>	302	64,53
<i>An. albitarsis s.l.</i>	89	19,02
<i>An. benarrochi B</i>	43	9,19
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	17	3,63
<i>An. triannulatus</i>	11	2,35
<i>An. neomaculipalpus</i>	3	0,64
<i>An. braziliensis</i>	3	0,64
Total	468	100,00

hembra. De acuerdo con las determinaciones, se logró el establecimiento de 27 familias de *An. benarrochi B*, 14 familias de *An. rangeli*, 7 familias de *An. albitarsis s.l.*, 3 familias de *An. triannulatus s.l.* y 1 familia de *An. oswaldoi s.l.*

Se obtuvieron secuencias para los dos marcadores (*ITS-2* y *COI*) de 33 especímenes: 18 *An. benarrochi B*, 3 *An. albitarsis s.l.*, 3 *An. rangeli*, 3 *An. triannulatus s.l.*, 2 *An. punctimacula*, 1 *An. costai*, 2 *An. neomaculipalpus*, y 1 *An. mattogrossensis*. De un espécimen se obtuvo solamente secuencia de *ITS-2*: 1 *An. oswaldoi s.l.*, y de 19 especímenes de *An. darlingi* se obtuvieron solamente secuencias de *COI*. Las secuencias provinieron de especímenes obtenidos a partir de isofamilias y de las recolecciones en campo, determinados preliminarmente por las características morfológicas.

Las secuencias de *ITS-2* y *COI* obtenidas a partir de los especímenes, fueron incluidas en el *GenBank* con los números de acceso que se presentan a continuación. Para *ITS-2*, fueron: *An. benarrochi B* (JX198285 - JX198302), *An. albitarsis s.l.* (JX198279 - JX198281), *An. rangeli* (JX198282 - JX198284), *An. triannulatus s.l.* (JX198276 - JX198278), *An. punctimacula* (JX198303 - JX198304), *An. costai* (JX198308), *An. neomaculipalpus* (KX198305 - JX198306), *An. oswaldoi s.l.* (JX198309) y *An. mattogrossensis* (JX198307). Para *COI*, fueron: *An. benarrochi B* (JX205097 - JX205110), *An. albitarsis s.l.* (JX205114 - JX205116), *An. rangeli* (JX205117 - JX205120), *An. triannulatus s.l.* (JX205111 - JX205113), *An. punctimacula* (JX205122 - JX205123), *An. costai* (JX205127 - JX205128), *An. neomaculipalpus* (JX205124 - JX205125), *An. mattogrossensis* (JX205126) y *An. darlingi* (JX435780 - JX435797). Las determinaciones preliminares se confirmaron con las comparaciones

de las secuencias del *GenBank*, a excepción de las especies *An. punctimacula* y *An. neomaculipalpus*, para las cuales no había secuencias disponibles para comparar. Los resultados se presentan en el cuadro 3.

Un total de 1.067 individuos identificados como *An. benarrochi B* o *An. oswaldoi s.l.*, recolectados en las diferentes áreas y periodos de muestreo, se procesaron por PCR-RFLP del *ITS-2* del ADN ribosómico. En 1.045 de los individuos se observaron las bandas esperadas para la especie *An. benarrochi B* (365, 137 y 38 pb). El patrón de corte esperado para *An. oswaldoi s.l.* (493 y 38 pb) solo se evidenció en 22 de las muestras.

Determinación de la capacidad infecciosa natural de Plasmodium

Se examinaron 5.038 especímenes por ELISA. El número de especímenes por especie en los cuales se detectó la proteína del circumsporozoíto se presenta en el cuadro 4. *Anopheles benarrochi B* fue la única especie encontrada naturalmente infectada con *P. vivax* 210 y VK 247. Los cinco individuos se recolectaron en el municipio de Puerto Leguizamo, en las localidades La Concepción y El Tablero, a las 18:00 en el intradomicilio y en el peridomicilio. Los especímenes de las demás especies, incluyendo aquellas con antecedentes vectoriales, como *An. darlingi*, *An. rangeli*, *An. albitarsis s.l.*, *An. oswaldoi s.l.* y *An. punctimacula*, fueron negativos para la proteína del circumsporozoíto.

Discusión

Durante el desarrollo de este trabajo se encontraron 11 especies de *Anopheles* (*An. albitarsis s.l.*, *An. benarrochi B*, *An. braziliensis*, *An. costai*, *An. darlingi*, *An. mattogrossensis*, *An. neomaculipalpus*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. punctimacula*, *An. rangeli* y *An. triannulatus s.l.*) en los municipios de Puerto Asís y Puerto Leguizamo, departamento del Putumayo. La especie más abundante recolectada con atrayente humano en todos los periodos de estudio fue *An. benarrochi B*. Esta especie, pese a su abundancia picando humanos, no se recolectó en ninguno de los hábitats larvarios identificados cerca de las casas, posiblemente por el escaso número de criaderos encontrados o porque los criaderos de esta especie están lejos de las viviendas y en lugares más sombreados. El escaso número de criaderos muestreados no permite hacer inferencias. De acuerdo con este trabajo y con los desarrollados anteriormente por Quiñones, *et al.* (5), las características de los criaderos de *An.*

Cuadro 3. Homología de las secuencias de ITS-2 y COI con secuencias disponibles en el GenBank

Especie	Código en GenBank	Secuencia existente en GenBank	% identidad	Determinación	Procedencia	Código en GenBank	Secuencia existente en GenBank	% identidad	Determinación	Procedencia
<i>An. benarrochi</i> B	JX198285	AY684976	100	<i>An. benarrochi</i> B	Putumayo, Ruiz, et al., 2005	JX205097	-	-	-	-
	- JX198302	- AY684984	-	-	-	- JX205110	-	-	-	-
<i>An. albitarsis</i> s.l.	JX198279	AY028127	99	<i>An. marajoara</i>	Chocó, Linton, et al., 2001	JX205114	HM022401	99	<i>An. marajoara</i>	Meta, Ahumada, et al., 2010
	- JX198281	-	-	-	-	- JX205116	HQ335349	98	<i>An. albitarsis</i> F	Krzywinski, et al., 2011
<i>An. rangeli</i>	JX198282	DQ666854	100	<i>An. rangeli</i>	Putumayo, Quiñones, et al., 2006	JX205117	HM022391	100	<i>An. rangeli</i>	Meta, Ahumada, et al., 2010
	- JX198284	- DQ666910	-	-	-	- JX205120	- HM022392	-	-	-
<i>An. triannulatus</i> s.l.	JX198276	AF462377	100	<i>An. triannulatus</i>	Rondonia, Brasil, Marelli, et al., 2005	JX205111	HM022387	98	<i>An. triannulatus</i>	Meta, Ahumada, et al., 2010
	- JX198278	-	-	-	-	- JX205113	-	-	-	-
<i>An. mattogrossensis</i>	JX198307	AF461754	98	<i>An. mattogrossensis</i>	Rondonia, Brasil, Marelli, et al., 2005	JX205126	-	-	-	-
<i>An. costai</i>	JX198308	HM022433	92	<i>An. costai</i>	Meta, Ahumada, et al., 2010	JX205127	HM022403	99	<i>An. costai</i>	Meta, Ahumada, et al., 2010
	-	-	-	-	-	- JX205128	-	-	-	-
<i>An. oswaldoi</i> s.l.	JX198309	AF55068	98	<i>An. oswaldoi</i>	Acre, Brasil, Marelli, et al., 1999	-	-	-	-	-
<i>An. darlingi</i>	-	-	-	-	-	JX435780	GO918273	99	<i>An. darlingi</i>	Manaos, Brasil, Moreno, et al., 2010
	-	-	-	-	-	- JX435797	-	-	-	-
<i>An. neomaculipalpus</i>	KX198305	-	-	-	-	JX205124	-	-	-	-
	- JX198306	-	-	-	-	- JX205125	-	-	-	-
<i>An. punctimacula</i>	JX198303	-	-	-	-	JX205122	-	-	-	-
	- JX198304	-	-	-	-	- JX205123	-	-	-	-

Cuadro 4. Infección con *Plasmodium vivax* detectada por ELISA en mosquitos *Anopheles* recolectados con atrayente humano, en Puerto Asís y Puerto Leguízamo, Putumayo, entre noviembre de 2006 y agosto de 2007

Especie	Mosquitos examinados por ELISA	Positivos	Porcentaje de infección
<i>An. benarrochi</i> B	3.761	5	0,13
<i>An. darlingi</i>	1.190	-	
<i>An. albitarsis</i> s.l.	23	-	
<i>An. oswaldoi</i> s.l.	18	-	
<i>An. rangeli</i>	18	-	
<i>An. triannulatus</i> s.l.	11	-	
<i>An. mattogrossensis</i>	6	-	
<i>An. neomaculipalpus</i>	5	-	
<i>An. costai</i>	4	-	
<i>An. punctimacula</i>	2	-	
Total	5.038	5	0,10

benarrochi B hasta el momento no se conocen. Su descripción es necesaria para conocer aspectos de su biología importantes en la toma de decisiones en términos de alternativas para control vectorial.

Anopheles rangeli representó aproximadamente el 62 % de los individuos recolectados en reposo animal; por el contrario, en recolecciones con atrayente humano, solo representó el 0,31 % del total, lo que demuestra un acentuado comportamiento zoofílico y concuerda con lo reportado por Faran (16), quien la describió como una especie que se recolecta principalmente sobre caballos y ganado.

Anopheles darlingi, reconocido vector de paludismo en el país, solo se encontró en el municipio de Puerto Leguízamo, en las localidades La Quebradita y Puntales. Estos resultados están de acuerdo con la distribución reportada para esta especie en trabajos desarrollados anteriormente en el departamento del Putumayo, los cuales la restringen a los límites con el Amazonas y la responsabilizan de mantener el principal foco de transmisión de *P. falciparum* (5).

Se confirmó la identidad de las especies al compararlas con las secuencias de *ITS-2* del ADN y el gen *COI* del ADNmt disponibles en el *GenBank*. Esto demuestra la utilidad de esta metodología, la cual, en conjunto con la observación de caracteres morfológicos de los estadios asociados de huevo, larva, pupa y adulto, se constituyen en una herramienta útil que permite la determinación de especies pertenecientes a complejos, siendo particularmente relevante en estudios de incriminación de vectores de malaria, donde es necesaria una correcta determinación de los especímenes. Sin embargo, aún varios de los

complejos están por ser resueltos, como es el caso del complejo *An. albitarsis* s.l., *An. oswaldoi* s.l. y *An. triannulatus* s.l., y de otras especies no se encontraron secuencias disponibles en el *GenBank* para hacer comparaciones, como fueron *An. punctimacula* y *An. neomaculipalpus*. Las determinaciones taxonómicas para estas especies se basaron en la morfología de los estados asociados y de las hembras adultas, y se aportaron las secuencias al *GenBank* lo que facilitará trabajos futuros.

Las secuencias de *ITS-2* asociadas a isofamilias de *An. benarrochi* B mostraron un 100 % de identidad con las secuencias sometidas por Ruiz, *et al.*, 2005, para este mismo departamento. Las evidencias morfológicas, moleculares y de comportamiento, discutidas por Ruiz, *et al.* (6), y acumuladas durante los trabajos desarrollados anteriormente en el Putumayo, sustentan la necesidad de describir la especie que hasta ahora se ha venido denominando *An. benarrochi* B. Sallum, *et al.* (31), discute la necesidad de establecer la definición morfológica y molecular de las especies del complejo *An. benarrochi* s.l. para resolver el estatus taxonómico de las poblaciones encontradas en Brasil, Perú y Colombia, dado que se han encontrado diferencias en la morfología de los genitales de los machos y en el *ITS-2* del ADN de *An. benarrochi* de Acrelandia, Acre, Brasil, con las de Putumayo sometidas por Ruiz, *et al.* (6).

Con relación al complejo *An. oswaldoi* s.l., Ruiz, *et al.* (Ruiz F, Herrera M, Sallum M, Motoki M, Wilkerson R, Ponsonby D, *et al.* Molecular systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) in South America. In: The 16th European Society for Vector Ecology Conference, March 25-28, 2008, Fitzwilliam College, Cambridge) diferenciaron cuatro especies, a saber, *An. oswaldoi* s.s., y *An. oswaldoi* A, B y C, con base en la morfología de los genitales de los machos y en secuencias de *ITS-2* y *COI*, y propusieron su distribución así: en Brasil, *An. oswaldoi* s.s., A y B; en Colombia, *An. oswaldoi* A, B y C; en Ecuador, *An. oswaldoi* B y C; en Perú, *An. oswaldoi* C; y en Trinidad y Venezuela, *An. oswaldoi* B. Infortunadamente, las secuencias de estos especímenes aún no están disponibles en el *GenBank*, por lo que no fue posible comparar las secuencias de los especímenes obtenidas en este trabajo. Al comparar estas secuencias con las del *GenBank*, correspondientes a la descripción reiterada de *An. oswaldoi* s.s. de muestras provenientes de Espirito Santo y São Paulo (Brasil) (números de acceso EF457228-

EF457239), se demuestra una identidad del 97 %, lo cual sugiere que la especie de *An. oswaldoi s.l.* presente en el Putumayo es probablemente otra de este complejo.

Para el complejo *An. albitarsis s.l.*, se han descrito seis especies: *An. albitarsis* Lynch-Arribáizaga, *An. deaneorum* Rosa-Freitas, *An. marajoara* Galvão y Damasceno, *An. oryzalimnetes* Wilkerson y Motoki, *An. janconnae* Wilkerson y Sallum y *An. albitarsis* F (32), de las cuales, en Colombia se han reportado *An. marajoara*, *An. albitarsis* F (33); y, recientemente, Gutiérrez, *et al.* (32), al analizar especímenes de la Costa Caribe de Colombia, describió un linaje cercano a *An. janconnae*. Las secuencias de Putumayo presentaron una homología del 99 % con *An. marajoara*, tanto por *ITS-2* como por *COI*. Sin embargo, mostraron también una gran homología con *An. albitarsis* F. Debido a la complejidad que presenta la discriminación de las especies de este complejo y a la necesidad de realizar estudios más completos y a mayor escala que involucren las especies a lo largo de su distribución en Latinoamérica, la identidad de la especie presente en Putumayo no es clara y se clasifica como *An. albitarsis s.l.*

En este trabajo, la especie *An. benarrochi* B se encontró naturalmente infectada mediante la proteína del circumsporozoíto de *P. vivax* (VK 210 y VK 247), con una tasa de infección total de 0,13 %, dos de ellos infectados con *P. vivax* 210 y tres con *P. vivax* 247. Esta tasa de infección es más baja que la reportada para especies consideradas vectores primarios, como *An. darlingi* (entre 0,98 % y 2,1 %) (8,34), lo cual podría explicar por qué *An. benarrochi* B no se había encontrado infectada en los anteriores estudios en el departamento, y es comparable con la obtenida para esta misma especie en los estados de Loreto y Ucayali (Perú) (0,14 % en 6.323 grupos de mosquitos evaluados), donde cumple un importante papel en la transmisión del paludismo (8). Que esta especie haya sido encontrada naturalmente infectada únicamente con parásitos de *P. vivax*, no es sorprendente, dado que en los últimos siete años los casos de malaria reportados por el departamento se deben principalmente a esta especie de *Plasmodium*, y particularmente para el año 2007, durante el cual se recolectó el mayor número de especímenes de *Anopheles* aquí evaluados, el 97,20 % de los casos diagnosticados fueron causados por *P. vivax*. Además, estos resultados también podrían sugerir que la longevidad de esta especie no es

suficiente como para soportar el desarrollo de *P. falciparum*.

Los cinco *An. benarrochi* B positivos fueron recolectados en agosto en tres días diferentes, tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio, entre las 18:00 y las 19:00, periodo en que los habitantes de la zona están afuera de sus casas. En los estudios de Quiñones, *et al.* (5), el pico de actividad de esta especie se estableció entre las 18:00 y las 24:00. Estos resultados tienen implicaciones importantes para el control de la malaria en esta región y, dada la abundancia de esta especie y su asociación con los humanos, se puede recomendar la implementación de métodos de protección personal, tales como el uso de repelentes y de toldillos para disminuir el contacto entre los humanos y el vector.

En el muestreo en La Quebradita, Puerto Leguízamo, la especie más abundante fue *An. darlingi*, reconocida como vector primario en el país (15,35) y la cual ha sido encontrada naturalmente infectada con esporozoítos de *P. falciparum*, *P. vivax* 210 y *P. vivax* 247 a lo largo y ancho de la Amazonia, con tasas de infección que varían entre 2,7 y 22,4 % (8,15,33,36-38). En este estudio, *An. darlingi* no se encontró naturalmente infectada con ninguna de las especies de *Plasmodium* evaluadas, resultado similar al obtenido en estudios previos de infección natural en el departamento (5). Sin embargo, cabe destacar que los individuos que se evaluaron solo correspondían a los recolectados durante un mes.

Los resultados del presente trabajo sugieren que la nueva especie, hasta ahora designada como *An. benarrochi* B, puede jugar un papel importante en la transmisión de malaria en el departamento del Putumayo, dada su gran antropofilia y a que se encontró naturalmente infectada con *P. vivax*. Estos hallazgos se suman a los obtenidos por Quiñones, *et al.* (5), quienes incriminan a *An. oswaldoi s.l.* y a *An. rangeli* como vectores en el departamento, demostrando la heterogeneidad que los vectores de malaria pueden exhibir en una región en particular. Se requieren estudios posteriores que permitan describir y saber más de la biología de este nuevo vector de malaria en Colombia, como son los tipos de criaderos, el estado de vulnerabilidad ante los insecticidas y su capacidad vectorial, información que será de utilidad para la selección y evaluación entomológica de las medidas de control de malaria por parte de la secretaría de salud del Putumayo.

Agradecimientos

A los funcionarios de la Dirección Administrativa de Salud de Putumayo (DASALUD), por la colaboración para el trabajo de campo, particularmente a Ignacio Palacios y al Grupo de Entomología; a las comunidades de los municipios de Puerto Asís y Puerto Leguizamó, por permitir el ingreso a sus casas durante el muestreo; a Lucas A. Alcalá, por el apoyo en el procesamiento de las muestras en el laboratorio; a Robert Wirtz, por la donación de los anticuerpos monoclonales para el desarrollo de la técnica ELISA para determinar la infección natural en mosquitos por parásitos del género *Plasmodium* spp.; y a Jan Conn, por el apoyo con la secuencias de los especímenes.

Conflicto de intereses

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

Financiación

Este proyecto fue financiado por Colciencias, código 110134319196.

Referencias

1. **World Health Organization.** World Malaria Report 2010. Ginebra: World Health Organization; 2010. p. 1-204.
2. **Padilla-Rodríguez JC, Uribe GÁ, Araújo RM, Narváez PC, Valencia SH.** Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(Suppl.1):114-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900015>
3. **Peña MY, Revelo D, Ordóñez LJ, López MC, Aguilera G.** Comportamiento epidemiológico de malaria en el departamento de Putumayo. Fecha de consulta: 14 de junio de 2012. Disponible en: <http://www.orasconhu.org/documentos/Anexo%2014y%20COL%20M&E%202009.pdf>.
4. **Departamento Administrativo de Salud Putumayo.** Informe casos de malaria por localidad, periodo y grupos de edad 2000-2007. Mocoa: DASALUD Putumayo; 2007. p. 1-32.
5. **Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton YM.** Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:617-23. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000600007>
6. **Ruiz F, Quiñones ML, Erazo HF, Calle DA, Alzate JF, Linton YM.** Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. oswaldoi* from Southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:155-60. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000200008>
7. **Olano V, Brochero H, Sáenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica. 2001;21:402-83.
8. **Florez C, Fernández R, Escobedo KS, Vela Q, Schoeler GB.** Natural *Plasmodium* infections in *Anopheles darlingi* and *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) from Eastern Peru. J Med Entomol. 2004;41:489-94. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.489>
9. **Fernández LR, Schoeler G, Stancil J.** Presencia de *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* en áreas de selva con transmisión malárica. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2004;21:217-22.
10. **Branquinho MS, Araújo MS, Natal D, Marelli MT, Rocha RM, Taveira FA, et al.** *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:233.
11. **Hayes J, Calderón G, Falcon R, Zambrano V.** Newly incriminated *Anopheles* vectors of human malaria parasites in Junin Department, Peru. J Am Mosq Control Assoc. 1987;33:418-22.
12. **Rubio-Palís Y, Curtis CF.** Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. Med Vet Entomol. 1992;6:375-81.
13. **Povoa MM, Wirtz RA, Lacerda RNL, Miles MA, Warhust D.** Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, state of Amapá, Amazon Region, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:179-84. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762001000200008>
14. **Moreno JE, Rubio-Palís Y, Páez E, Perez E, Sánchez V, Vaccari E.** *Anopheles (Anopheles) neomaculipalpus*: A new malaria vector in the Amazon basin?. Med Vet Entomol. 2005;19:329-32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00572.x>
15. **Herrera S, Suárez M, Sánchez G, Quiñones M, Herrera M.** Uso de la técnica inmunoradiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoítos de *Plasmodium*. Colombia Médica. 1987;18:57-60.
16. **Faran ME.** A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Contrib Am Entomol Inst. 1980;15:1-125.
17. **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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000500009>
18. **Silva Do Nascimento TF, Wilkerson RC, Lourenco-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;43:455-9. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[455:MCOTSS\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[455:MCOTSS]2.0.CO;2)
19. **Quiñones ML, Harbach RE, Calle DA, Ruiz JF, Erazo HF, Linton YM.** Variante morfológica de adultos hembra de *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. Biomédica. 2001;21:351-9.
20. **Calle DA, Quiñones ML, Erazo H, Jaramillo N.** Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:1191-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000800021>

21. **Estrada D, Quiñones ML, Sierra D, Calle D, Ruiz F, Erazo H, et al.** Utilidad de la morfología de los huevos como un método indirecto para identificar *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García & Lopez, *Anopheles oswaldoi* (Peryassu) y *Anopheles rangeli* Gabaldon, Cova García & Lopez, (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomédica*. 2003;23:388-95.
22. **Faran ME, Linthicum KJ.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera, culicidae). *Mosq Syst*. 1981;13:1-81.
23. **Suárez MF, Quiñones ML, Fleming GA, Robayo M.** Guía introductoria a la morfología de *Anopheles* y clave para determinación de las principales especies de Colombia, DCD. Bogotá, D.C.: Ministerio de Salud; 1987. p. 43.
24. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia – Claves taxonómicas y notas de distribución. Cali: Universidad del Valle; 2007. p. 63.
25. **World Health Organization.** Manual on practical entomology in malaria. Geneva: WHO; 1975.
26. **Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE.** Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence between random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Ann Entomol Soc Am*. 2005;98:908-17. [http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0908:CSITAN\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0908:CSITAN]2.0.CO;2)
27. **Wirtz RA, Burkot TR, 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*. 1985;34:1048-54.
28. **Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, et al.** Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Org*. 1987;65:39-45.
29. **Wirtz RA, Sattabongkot J, Hall T, Burkot TR, Rosenberg R.** Development and evaluation of an enzyme – linked immunosorbent assay for *Plasmodium vivax* VK 247 sporozoites. *J Med Entomol*. 1992;29:854-7.
30. **Beier MS, Schwartz IK, Beier JC, Perkins PV, Onyango F, Koros JK, et al.** Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and Oocyst infected *Anopheles* from Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;39:323-7.
31. **Sallum MA, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Dos Santos CL.** Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J Med Entomol*. 2008;45:970-81. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[970:IIANDC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[970:IIANDC]2.0.CO;2)
32. **Gutiérrez LA, Orrego LM, Gómez GF, López A, Luckhart S, Conn JE, et al.** A new mtDNA COI gene lineage near *An. janconnae* of the Albitarsis Complex from Caribbean Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:1019-25. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000800011>
33. **Brochero HM, 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;76:1113-7.
34. **Povoa MM, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JC, Nazaré M, Segura O, et al.** Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belem, Pará, Brazil. *J Med Entomol*. 2003;40:379-86. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.379>
35. **Elliot R.** The influence of vector behavior on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 1972;21:755-63.
36. **Da Rocha JA, De Oliveira SB, Povoa MM, Moreira LA, Krettli AU.** Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:872-7.
37. **De 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.
38. **Tadey WP, Thatcher D.** Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42:87-94. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652000000200005>