

## Detección de mosquitos *Anopheles* infectados naturalmente con *Plasmodium* spp. en Puerto Libertador, Córdoba, Colombia

Detection of naturally infected *Anopheles* mosquitoes by *Plasmodium* spp. in Puerto Libertador, Cordoba, Colombia

Natalí Álvarez\*, Doris A. Rosero†, Giovan F. Gómez‡, Margarita M. Correa§

### RESUMEN

#### INTRODUCCIÓN

Las especies de *Anopheles* varían en su capacidad de transmitir los parásitos causantes de la malaria; por ello, es importante realizar estudios para conocer cuáles son las especies de *Anopheles* presentes en áreas endémicas para la enfermedad y determinar su papel en la transmisión.

#### OBJETIVO

Determinar las especies de *Anopheles* involucradas en la transmisión de malaria en la localidad de Juan José, Puerto Libertador, Córdoba, Colombia.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

La infectividad natural por *Plasmodium vivax* VK210, *P. vivax* VK247 y *Plasmodium falciparum* se evaluó por ELISA, empleando la cabeza y el tórax de cinco mosquitos de la misma especie por pozo. Los resultados de ELISA con valores mayores al punto de corte se confirmaron por una segunda ELISA y por PCR anidada.

#### RESULTADOS

De 2.054 especímenes evaluados por ELISA, 2.038 fueron *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón; de estos, tres especímenes se encontraron infectados, dos con *P. vivax* VK210 y uno con *P. falciparum*, representando una tasa de infección de 0,15%. De 16 *Anopheles (Nys.) darlingi* Root evaluados, no se encontró ninguno infectado.

#### CONCLUSIONES

*An. nuneztovari* s.l. y *An. darlingi*, vectores primarios de malaria en Colombia, se hallaron presentes en la localidad de Juan José, Puerto Libertador; sin embargo, solo *An. nuneztovari* s.l. se halló infectado, indicando su participación en la transmisión en esta localidad. La realización de nuevos muestreos en Juan José permitirá una mejor comprensión del papel de *An. darlingi* en la transmisión. La información obtenida contribuirá al diseño e implementación de medidas de control dirigidas y efectivas.

#### PALABRAS CLAVES

*Anopheles*. Colombia. Malaria. *Plasmodium*. Prueba ELISA. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

\*Estudiante de Microbiología y Bioanálisis, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. †Microbióloga y Bioanalista, Estudiante de Maestría en Biología, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Microbiólogo y Bioanalista, Estudiante Doctorado en Ciencias Básicas Biomédicas, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. §PhD, Docente, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. §Contacto: mcorrea@quimbaya.udea.edu.co  
Recepción: 10-25-2011. Aceptación: 04-10-2012.

## SUMMARY

### INTRODUCTION

*Anopheles* species vary in their ability to transmit malaria parasites; therefore, it is important to conduct studies directed to determine the species present in malaria endemic regions and establish their role in transmission.

### OBJECTIVE

To determine the *Anopheles* species involved in malaria transmission in the locality of Juan José, Puerto Libertador, Córdoba, Colombia.

### MATERIALS AND METHODS

Natural infectivity by *Plasmodium vivax* VK210, *P. vivax* VK247 and *Plasmodium falciparum* was evaluated by ELISA using pools of the head and thorax of five mosquitoes of the same species per well. ELISA results with values greater than the cutoff point were confirmed by a second ELISA and nested PCR.

### RESULTS

From 2,054 specimens evaluated by ELISA, 2,038 were *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldon; from these, three specimens were found infected, two with *P. vivax* VK210 and one with *P. falciparum*, representing an infection rate of 0.15%. Of 16 *An. (Nys.) darlingi* Root evaluated, none was found infected.

### CONCLUSIONS

*An. nuneztovari s.l.*, and *An. darlingi*, two main malaria vectors of Colombia were present in Juan Jose, Puerto Libertador; however, only *An. nuneztovari s.l.*, was found infected, indicating its role in transmission in this locality. Further sampling in Juan Jose will allow for a better understanding of the role of *An. darlingi* in transmission. This information will contribute to the design and implementation of targeted and effective control measures.

### KEY WORDS

*Anopheles*. Colombia. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Malaria. *Plasmodium*. Polymerase Chain Reaction.

## INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y es transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*.<sup>1</sup> Aproximadamente la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad; de un millón de casos reportados para el 2009 en la Región de las Américas, Colombia aportó aproximadamente el 10%<sup>2</sup> y cerca del 85% del territorio cuenta con las características necesarias para el desarrollo de la enfermedad, constituyéndose en un problema importante de salud pública.<sup>3</sup> Para el año 2010, se reportaron 116.318 casos de malaria, siendo los departamentos de Antioquia y Córdoba los que contribuyeron con el mayor número de casos.<sup>4</sup> Según los registros, Antioquia es el departamento más endémico de Colombia y Córdoba es el segundo, pero se presume que existe gran subregistro. En Córdoba, para el año 2007 se reportaron 46.197 casos de malaria; de estos, el mayor número de casos se reportó en los municipios de Tierralta (37,5%), Puerto Libertador (29,01%), Montelibano (20,4%) y Valencia (10,9%).<sup>5</sup>

Para que se presente la malaria, se requiere de la interacción del parásito con el hombre u hospedero intermediario y con el mosquito *Anopheles* u hospedero definitivo.<sup>6</sup> En Colombia se estima la presencia de unas 47 especies de *Anopheles*, de las cuales tres son reconocidas como vectores principales: *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, *Anopheles (Nys.) darlingi* Root y *Anopheles (Nys.) nuneztovari* Gabaldón. Otras especies constituyen vectores de importancia local, como: *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald, *Anopheles (Ano.) punctimacula* Dyar & Knab, *Anopheles (Kertessia) neivai* Howard, Dyar & Knab y *Anopheles (Ker.) lepidotus* Zavortink.<sup>7</sup> *Anopheles (Nys.) rangeli* Gabaldón y *Anopheles (Nys.) oswaldoi* Peryassu fueron encontrados infectados naturalmente por *Plasmodium vivax* en el Putumayo.<sup>8</sup>

La detección de infectividad natural de mosquitos anofelinos por *Plasmodium* spp., es un aspecto importante para la incriminación de las especies involucradas en la transmisión en las diferentes áreas endémicas. Varias pruebas se han utilizado para la detección de infectividad; tradicionalmente, se realizó visualización microscópica para determinar la presencia de oocistos en el intestino medio y esporozoitos en las

glándulas salivales de los especímenes. Las desventajas de esta estrategia es que los mosquitos deben ser examinados rápidamente después de ser capturados y no se diferencian las especies de *Plasmodium*.<sup>9,10</sup> En la actualidad, se usa con mucha frecuencia una prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), que utiliza anticuerpos monoclonales Mab, los que reconocen epítopes repetidos de la proteína del circunsporozoito (CSP),<sup>11,12</sup> la lectura de la prueba se realiza por la observación de una reacción colorimétrica que puede ser cuantificada por densitometría.<sup>11,13</sup> Entre sus desventajas se encuentran, problemas de sensibilidad y especificidad, pudiendo presentar reacciones inespecíficas y falsos positivos.<sup>14</sup> También se han descrito metodologías basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del parásito,<sup>14,15</sup> las cuales tienen la ventaja de tener alta sensibilidad. En la actualidad se utiliza con frecuencia una PCR anidada que emplea cebadores dirigidos al DNA que codifica la subunidad ribosomal pequeña de *Plasmodium*,<sup>15</sup> y recientemente, se describió una PCR basada en el gen que codifica para el citocromo b mitocondrial del parásito; la prueba detecta un polimorfismo específico de especie que permite discriminar a *Plasmodium falciparum* de *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*.<sup>14</sup>

En países latinoamericanos, la ELISA y la PCR anidada se han utilizado con frecuencia para la incriminación de especies vectoras de malaria.<sup>16,17,18,19</sup> En un estudio realizado en la localidad de Marabá, estado de Pará, Brasil, utilizando ELISA se hallaron varias especies infectadas naturalmente, así: *An. darlingi* con *P. vivax* VK247, *P. malariae* y *P. falciparum* con una Tasa de Infección (TI) = 22,4%, *An. (Nys.) albitarsis* Lynch Arribalzaga infectado con *P. vivax* en sus dos variantes (TI= 5,2%), *An. (Nys.) rondoni* Neiva & Pinto fue positivo para *P. vivax* VK210 y *P. falciparum* (TI= 3,6%); estos resultados se confirmaron por PCR anidada. Adicionalmente, la PCR detectó infección natural en otras especies no incriminadas por ELISA, como *An. nuneztovari s.l.*, *An. (Nys.) triannulatus* Neiva & Pinto y *An. (Nys.) strodei* Root.<sup>16</sup> La prueba de ELISA también se utilizó para detectar especies infectadas naturalmente en la localidad de Serra do Navio, estado de Amapá, Brasil; en este estudio, *An. albitarsis* s.l. se encontró infectado por *P. vivax* VK247, *P. vivax* VK210, *P. malariae* y *P. falciparum* (TI: 0,8%), *An. (Nys.) braziliensis*

infectado con *P. malariae* (TI= 0,2%), *An. nuneztovari s.l.*, fue positivo para las dos variantes de *P. vivax* y *P. malariae*, (TI= 1,4%), *An. triannulatus s.l.*, se encontró positivo para *P. malariae*, (TI= 0,5%) y *An. oswaldoi s.l.*, positivo para *P. falciparum* (TI= 2,2%).<sup>17</sup> En Venezuela, en la localidad de Ocamo, estado de Amazonas, al sur de Venezuela, usando la prueba de ELISA se encontró a la especie más prevalente, *An. darlingi*, infectada con *P. vivax* VK247, *P. malariae* y *P. falciparum*, con una tasa de infección de 0,8%; otras especies presentes en el área como *An. braziliensis*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. mediopunctatus*, no se hallaron infectadas.<sup>18</sup>

En Colombia, en años recientes, se han realizado estudios empleando ELISA y PCR anidada para la incriminación de las especies vectoras en varias áreas endémicas para malaria. En un trabajo realizado en las regiones Atlántica y Pacífica, entre marzo de 2005 y agosto de 2006, se detectó a *An. albimanus* naturalmente infectado con *P. vivax* VK247 en Nuquí, Chocó y con *P. vivax* VK210 y *P. falciparum*, en Buenaventura, Valle del Cauca (TI para la región= 0,07%). *Anopheles neivai* también se encontró infectado con *P. falciparum* en Buenaventura (TI= 9,5%).<sup>12</sup> En un estudio posterior, realizado en Antioquia y Córdoba, departamentos que aportan el mayor número de casos de malaria del país, de marzo de 2007 a julio de 2008, se encontró que *An. nuneztovari s.l.*, era la especie más abundante en las localidades evaluadas de Córdoba y se halló infectado con *P. vivax* VK247 en los municipios de Montelibano y Tierralta (TI para las dos localidades= 0,4%) y *An. darlingi* se encontró infectado con *P. vivax* VK247 en Puerto Libertador (TI= 1,6%). En Antioquia la especie predominante fue diferente para cada localidad; en Turbo predominó *An. albimanus*; en Zaragoza, *An. braziliensis* y en El Bagre, *An. darlingi*. En este departamento no se halló ningún espécimen infectado.<sup>19</sup> En el Putumayo, sur de Colombia, vectores primarios como *An. nuneztovari s.l.*, y *An. albimanus* no se encontraron presentes durante un estudio en el que se evaluó infectividad natural por ELISA. En este, de 2.445 mosquitos analizados, se hallaron 36 especímenes naturalmente infectados con *P. vivax* VK210, que correspondieron a 35 *An. rangeli* (TI= 8,5%) y un *An. oswaldoi s.l.*, (TI= 0,3%); con lo que se incriminan dos nuevas especies como vectores de importancia local en Colombia.<sup>8</sup>

Teniendo en cuenta la relevancia de realizar estudios de incriminación vectorial para conocer cuáles son las especies vectoras en aéreas endémicas para

malaria, en el presente estudio se evaluó la infectividad natural por *Plasmodium* spp., en especímenes recolectados en la localidad de Juan José, municipio de Puerto Libertador, Córdoba, la cual se caracteriza por presentar alto número de casos de malaria (Índice Parasitario Anual >10). En esta localidad, para el año 2009 se reportaron 12.717 casos.<sup>20</sup> Luego, en Córdoba, durante el primer trimestre del 2010 se reportaron 5.441 casos, de los cuales 1.891 se notificaron en Puerto Libertador, siendo nuevamente la localidad con el mayor número de casos del departamento.<sup>21</sup> Dada las diferencias en ecología, comportamiento y hábitos de picadura de las especies anofelinas, es relevante establecer si son los vectores primarios reportados para Colombia u otras especies de importancia local, las que están involucradas en la transmisión en esta localidad. Este conocimiento permitirá contribuir al diseño e implementación de estrategias efectivas para el control de malaria en la localidad.<sup>22</sup>

## MATERIALES Y MÉTODOS

### RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES

Se seleccionaron para la evaluación de la infectividad especímenes recolectados en la localidad de Juan José, municipio de Puerto Libertador (N 07°44'18,6-W75°51'20,3"), Córdoba. Las principales actividades económicas en esta localidad son la producción agrícola de plátano, maíz, yuca y ñame, y la ganadería; la temperatura promedio es de 27 °C y la humedad relativa > 80% (GFGG, informe de salida de campo). Los especímenes se colectaron entre el 31 de julio y el 5 de agosto de 2009, de las 18:00-24:00 h, y se realizó un nictameral el día 3, de las 18:00-6:00 horas. La recolección se realizó en cebo humano protegido, bajo un protocolo y consentimiento informado para los colectores, que fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética, Sede de Investigaciones Universitarias, Universidad de Antioquia (SIU-UdeA). Para las capturas, se seleccionó una casa en la vereda Juan José, teniendo en cuenta su cercanía a los criaderos. Las capturas en cebo humano protegido fueron realizadas por un equipo de cuatro personas, dos personas ubicadas al interior de la vivienda (intradomicilio), y dos personas en el exterior de esta (peridomicilio). Los mosquitos fueron recolectados con capturador manual, exponiendo las pantorrillas durante 50 minutos cada hora.

Los especímenes fueron disectados, la cabeza y el tórax se conservaron en sílica para posteriormente ser procesadas en la ELISA, el abdomen, las alas y patas se preservaron en etanol al 95%, para luego realizarle extracción a los abdómenes para confirmación molecular de especies y PCR anidada en el caso de los positivos por la prueba de ELISA.

Previamente a la evaluación de la infectividad, los especímenes fueron identificados por caracteres morfológicos, empleando claves taxonómicas disponibles,<sup>23-25</sup> almacenados individualmente en sílica gel para su preservación. Posteriormente, fueron disectados; la cabeza y el tórax se conservaron en sílica para ser procesados en la prueba de ELISA. Los abdómenes, las patas y alas se preservaron en etanol al 95% para la extracción del ADN. El material de extracción del abdomen se utilizó para la confirmación molecular de especies y para la PCR anidada que se realiza a los especímenes que den positivos por la prueba de ELISA. Las patas y alas se conservan para realizar nuevas extracciones, en caso de ser necesario obtener más DNA. Adicionalmente, las alas y patas posteriores del 5% de los especímenes fueron montados entre lámina y laminilla, para respaldo entomológico. La identificación morfológica fue corroborada utilizando una PCR-RFLP-ITS2.<sup>26-28</sup>

### DETECCIÓN DE LA INFECTIVIDAD NATURAL POR *PLASMODIUM* SPP. POR ELISA

La prueba de ELISA se usa para el tamizaje, permitiendo evaluar un mayor número de especímenes por proceso, dado que en la literatura se ha demostrado que es posible detectar infectividad en mezclas de mosquitos.<sup>18,19, 29</sup> Por ello, en este trabajo se procesaron la cabeza y el tórax de cinco mosquitos de la misma especie por pozo del plato de ELISA. Las mezclas se maceraron con 50 µL de tampón de bloqueo y el detergente IGEPAL. Para determinar la presencia de la proteína del circumesporozoito (CSP) en los macerados, se utilizaron anticuerpos monoclonales (Mab) específicos para cada especie, *P. vivax* (VK210 y VK247) y *P. falciparum*; cada anticuerpo fue evaluado en platos separados, siguiendo una metodología estandarizada en el Grupo de Microbiología Molecular.<sup>12,19</sup> Tanto los controles positivos como los anticuerpos fueron adquiridos directamente del Centro para el Control y la Prevención de

Enfermedades (CDC, Atlanta, USA); los controles negativos fueron mosquitos de colonia donados por el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET). Los resultados de la prueba se determinaron a una absorbancia de 405 nm en un lector de microplatos BioRad (Hercules, California, USA); con las lecturas se calculó un punto de corte correspondiente al promedio de los datos de absorbancia de los controles negativos, multiplicado por dos. Las muestras cuyos valores de absorbancia estuvieron por encima del punto de corte, incluyendo aquellas que no presentaban una reacción de color fuerte, fueron sometidas a una segunda ELISA y se evaluaron por PCR anidada.

#### CONFIRMACIÓN DE LA INFECTIVIDAD POR PCR ANIDADA

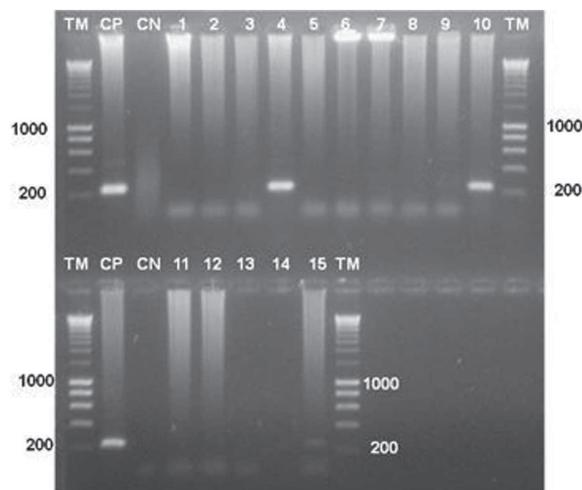
Para conocer cuál era el mosquito(s) infectado(s) en las mezclas que presentaron valores por encima del punto de corte, se extrajo el ADN del abdomen que se había preservado de cada uno de los especímenes de dicha mezcla. Para la extracción del ADN se empleó un protocolo de precipitación salina optimizado en el laboratorio de Microbiología Molecular.<sup>30</sup> Se utilizaron los cebadores dirigidos al DNA que codifica para la subunidad ribosomal pequeña del parásito, los cuales detectan *Plasmodium* spp.; las condiciones de la PCR fueron las estandarizadas en el laboratorio.<sup>19</sup> Con esta PCR sólo se pretende confirmar infectividad por el parásito sin definir su especie (sólo se determina el género, *Plasmodium* spp.); ésta se determina durante la prueba de ELISA que utiliza anticuerpos específicos para cada especie. Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 µg/mL), y se visualizaron en un transiluminador BioRad (Hercules, California, USA).

La tasa de infectividad se calculó teniendo en cuenta el número de especímenes infectados dividido por el total de analizados de la misma especie en la localidad. Los intervalos de confianza de la proporción de mosquitos infectados se hallaron asumiendo una distribución binomial, utilizando el programa estadístico EPIDAT 3.1.<sup>31</sup>

## RESULTADOS

De los 2.070 especímenes recolectados en la localidad de Juan José utilizando cebo humano, 99,2%

correspondieron a *An. nuneztovari s.l.*, y 0,8% a *An. darlingi*. En la prueba de ELISA se evaluaron 2.054 especímenes (cabeza y tórax), agrupados en mezclas de máximo cinco ejemplares por especie. En la primera ELISA, la lectura por densitometría indicó que 388 mezclas eran negativas y 23 mezclas mostraron valores superiores al punto de corte estimado para el respectivo ensayo. Al correr la segunda ELISA sólo dos mezclas dieron resultados positivos. Sin embargo, en este trabajo se confirmaron por PCR anidada todos los especímenes de las mezclas que dieron el valor superior al punto de corte durante la primera ELISA; estos correspondieron a 115 mosquitos que fueron evaluados individualmente en la PCR anidada. De estos, se encontraron tres mosquitos *An. nuneztovari s.l.*, infectados, dos con *P. vivax* VK210 y uno con *P. falciparum* (Figura 1), lo que correspondió a una tasa de infección de 0,15% (Tabla 1). No se halló ningún *An. darlingi* infectado.



**Figura 1.** Detección de *An. nuneztovari s.l.* naturalmente infectado con *Plasmodium* spp. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles. **TM:** marcador de peso molecular, 200-1000 pb. **CP:** control positivo, **CN:** control negativo, **1-15:** productos de PCR anidada correspondientes a especímenes individuales que dieron resultados mayores al punto de corte en la ELISA, 1-5 especímenes de la mezcla uno, 6-10. Mezcla dos, 11-15. Mezcla tres. Muestras positivas: 4, 10, 15.

**Tabla 1.** Especies de *Anopheles* recolectadas entre el 31 de julio y el 5 de agosto de 2009 en Puerto Libertador y tasas de infección por *Plasmodium* spp.

Especie	No. de especímenes analizados	No. de especímenes infectados	Especie de <i>Plasmodium</i> detectada	Tasa de infección (%)	Intervalo de confianza al 95%
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	2.038	2 1	<i>P. vivax</i> VK210 <i>P. falciparum</i>	0,15%*	0,030 – 0,430
<i>An. darlingi</i>	16	0	0	0	0

\*La tasa de infección fue calculada teniendo en cuenta los resultados de la ELISA y confirmación por PCR anidada.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que *An. nuneztovari s.l.*, y *An. darlingi*, vectores primarios de la malaria en Colombia, eran las especies presentes en la localidad de Juan José durante los muestreos realizados entre el 31 de julio y el 5 de agosto de 2009; estas especies son buenos vectores del parásito, lo que sugiere un mayor riesgo para la malaria en esta localidad. *An. nuneztovari s.l.*, fue la especie predominante, representando el 99,2% de los especímenes identificados; estos datos son similares a los obtenidos en un estudio previo realizado en cuatro municipios del departamento de Córdoba: Puerto Libertador, Valencia, Tierralta y Montelíbano, desde marzo de 2007 hasta julio del 2008, en el cual de un total de 1.201 mosquitos identificados, el 88% correspondían a *An. nuneztovari s.l.*,<sup>19</sup> En conjunto, los resultados de estos trabajos sugieren la importancia de *An. nuneztovari s.l.*, en este departamento, donde esta especie muestra ser predominante. Un factor que puede estar favoreciendo la presencia de esta especie en estas localidades, es que estas cuentan con las características óptimas para el desarrollo de criaderos de *An. nuneztovari s.l.*, como los propiciados por el gran desarrollo ganadero de la región; esta especie se cría bien en aguas pantanosas, huellas de animales, arroyos de agua dulce parcial o totalmente expuestos al sol, además, tiene preferencia por lugares cercanos a matorrales contiguos a las viviendas.<sup>24,32</sup> Al igual que en Córdoba, en otros países de Latinoamérica se ha demostrado la importancia de *An. nuneztovari s.l.*, en regiones endémicas para malaria; en un estudio realizado en Mérida, Venezuela, los resultados mostraron que de un total de 1.561 mosquitos recolectados, *An. nuneztovari s.l.*, se halló

como la especie más predominante (89,6%); además, se encontró que tenía hábitos endofágicos y preferencia por hospederos humanos, cuando anteriormente se describió como una especie altamente exofílica y exofágica, pero dado a que en esta área hacia 4 años no se fumigaba, los autores sugirieron que se presentó un cambio de comportamiento en esta especie.<sup>33</sup>

Según los resultados del presente trabajo, *An. nuneztovari s.l.*, estaba infectado con *P. falciparum* y *P. vivax* VK210. Resultados similares fueron encontrado en un estudio realizado por Gutiérrez et al.,<sup>19</sup> en el que también se encontró esta especie infectada en especímenes de Montelíbano y Tierralta, ambos municipios en Córdoba; pero diferente a nuestros resultados, la cepa infectante fue *P. vivax* VK247. La variante *P. vivax* VK210 fue también hallada en especímenes *An. nuneztovari s.l.*, de los estados de Táchira y Barinas, Venezuela, donde también fue la especie más predominante (74,8%).<sup>34</sup> La tasa de infectividad hallada para *An. nuneztovari s.l.*, en la localidad de Juan José fue de 0,15% (3/2.038). Las tasas de infectividad que se han reportado para otras localidades del departamento de Córdoba varían, para Montelíbano fue de 0,5% (3/613) y para Tierralta de 0,6% (1/154).<sup>19</sup> Estas tasas de infectividad son menores a las obtenidas en estudios realizados en Brasil. Las tasas de infectividad para *An. nuneztovari s.l.*, en Boa Vista, Roraima, fueron de 2,6% (1/38), encontrándose infectado con *P. vivax*.<sup>29</sup> Llama la atención esta diferencia entre las tasas de infectividad reportadas en estos estudios, puesto que el comportamiento descrito como característico para *An. nuneztovari s.l.*, en el Amazonas brasileiro es una tendencia altamente zoofílica,<sup>28</sup> que se correlaciona con el citotipo A

presente en la región. En Colombia se encuentra el citotipo C el cual se caracteriza por ser antropofílico y endofágico.<sup>35</sup> Lo anterior sugiere que además del comportamiento, otros factores deben estar influenciando la infectividad natural de este vector en Colombia, y futuros estudios podrían elucidar por qué, a pesar de que *An. nuneztovari s.l.*, se considera un buen vector, las tasas de infectividad encontradas son relativamente bajas en las zonas endémicas del país.

En el muestreo realizado en Juan José, *An. darlingi* no se encontró infectado por *Plasmodium* spp.; sin embargo, Gutiérrez et al.<sup>19</sup> lo reportaron infectado por *P. vivax* VK247 (TI: 1,6%, 1/69) en La Bonga, otra localidad de Puerto Libertador. La no detección de especímenes *An. darlingi* infectados en Juan José podría tener varias explicaciones: 1) bajas densidades atribuidas a la época de muestreo que determina en parte la fluctuación y densidad de las especies anofelinas,<sup>36</sup> 2) la reducción en el número de especímenes debido a los programas de control vectorial realizados en estas zonas y 3) la baja tasa de infectividad para la mayoría de las especies de *Anopheles* en Colombia. Todo lo anterior puede conducir a que cuando se evalúen un bajo número de especímenes, no se detecten infectados.<sup>12,19</sup> Como en Colombia, en Brasil *An. darlingi* es un importante vector de malaria, pero también allí, en los diferentes trabajos publicados no siempre se ha detectado infectado. Por ejemplo, en el estado de Amapá, *An. darlingi* ha sido asociado a malaria por *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*,<sup>37</sup> pero, a pesar de esto, en la municipalidad de Serra do Navio, no fue posible hallarlo infectado, mientras que *An. nuneztovari s.l.*, se encontró infectado con *P. vivax* VK210, con una tasa de infección de 1,4% (4/290).<sup>17</sup> Se conoce que *An. nuneztovari s.l.*, es una especie más resistente que *An. darlingi* a ambientes modificados, tolerando la exposición de los criaderos a luz solar y sobreviviendo en aguas más turbias,<sup>24,36</sup> lo que puede contribuir a que aumente la población en lugares donde se presentan disturbios ecológicos. El aumento en densidad puede favorecer la probabilidad de encontrarlo infectado.

Este trabajo permite también observar la diferencia en especificidad de la prueba de ELISA y la PCR anidada. Durante la evaluación preliminar con ELISA 23 mezclas correspondientes a 115 especímenes, mostraron resultados cercanos al punto de corte, sin embargo, al ser evaluados individualmente por PCR

anidada, solo tres fueron positivos (Figura 1). Se ha reportado ampliamente en la literatura que la ELISA presenta resultados inespecíficos y falsos positivos,<sup>14</sup> y que la PCR tiene una mayor sensibilidad, pudiendo detectar 10 esporozoitos por mosquito,<sup>15</sup> mientras que la ELISA detecta entre 20 y 50.<sup>13</sup> De acuerdo a los resultados del presente estudio, se sugiere que la prueba de ELISA se utilice como prueba de tamización, ya que esta permite evaluar de una forma más rápida un gran número de mosquitos al procesarlos como mezclas. Luego, los resultados deberán confirmarse con la PCR anidada, la cual permite detectar el/los especímenes infectados en la mezcla, y además tiene una mayor sensibilidad y especificidad.

## CONCLUSIONES

En general, los resultados de este estudio evidencian que *An. nuneztovari s.l.*, continúa desempeñando un papel importante en la transmisión en la localidad de Juan José, ubicado en una importante zona endémica para malaria de Colombia. A pesar de que *An. darlingi* ha sido reconocido como un importante vector de malaria en Colombia y fue recientemente hallado infectado en otras localidades de Puerto Libertador, en este trabajo no se encontró infectado, pero dado el bajo número de especímenes recolectados, no se puede descartar su participación en la transmisión de malaria. Los resultados de este estudio proveen información importante para el diseño de estrategias de control vectorial selectivo.

En este estudio solo se evaluó un período específico; por ello y para complementar la información, se han realizado nuevos muestreos en la localidad que permitan evaluar otros parámetros sobre el comportamiento y la diversidad real de las especies, información que contribuirá a un mejor entendimiento sobre la dinámica de la transmisión de la malaria en esta localidad.

## AGRADECIMIENTOS

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

## FUENTES DE FINANCIACIÓN

Trabajo anidado al proyecto código 8700-1615, financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación-CODI, Universidad de Antioquia, a MMC. El desarrollo del presente trabajo contribuyó a la formación de la estudiante de pregrado N. Álvarez.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existe un posible conflicto de intereses en este manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **World Health Organization.** Malaria, Fact sheet N°94, 2009. Consultado el 15 de enero de 2010. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>
2. **World Health Organization-WHO.** World Malaria Report. Geneva (Suiza) 2009. Consultado el 25 de febrero de 2010. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf).
3. **Mantilla G, Oliveros H, Barnston A.** The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960–2006. *Malar J.* 2009; 8: 1-11.
4. **Instituto Nacional de Salud.** Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública- Sistema de vigilancia en salud pública –SIVIGILA. 2010. Semana Epidemiológica 52.
5. **Gobernación de Córdoba.** 2008. Situación epidemiológica del programa de enfermedades transmitidas por vectores. Secretaría de Desarrollo de la Salud, Montería, Córdoba, Colombia. 19.
6. **Botero D, Restrepo M.** Malaria (Paludismo). En: Botero D, Restrepo M, editores. *Parasitosis humanas*. 4ª ed. Medellín: Fondo editorial CIB; 2003.p. 162-208.
7. **Quiñones ML, Herrera M, Orjuela LI.** Incriminación de vectores de malaria e implicaciones para su control. *Biomédica.* 2009; 29 (Supl): 116-8.
8. **Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Eraso 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.
9. **Collins FH, Zavala F, Graves PM, Cochrane AH, Gwadz RW, Akoh J, Nussenzweig RS.** First field trial of an immunoradiometric assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 1984; 33: 538-43.
10. **Beier JC, Perkins PV, Wirzt RA, Withmire RE, Mugambi M, Hockmeyer WT.** Field evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Plasmodium falciparum* sporozoite detection in anopheline mosquitoes from Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36: 459-68.
11. **Wirzt RA, Charoenvit Y, Burkot TR, Esser KM, Beaudoin RL, Collins WE.** Evaluation of monoclonal antibodies against *Plasmodium vivax* sporozoites for ELISA development. *Med Vet Entomol.* 1991; 5: 17-22.
12. **Gutierrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Trop.* 2008; 107: 99-105.
13. **Wirzt RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, Esse KM, Beaudoin RL, Andre RG.** Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ.* 1987; 65: 39-45.
14. **Hasan AU, Suguri S, Sattabongkot J, Fujimoto C, Amakawa M, Harada M, Ohmae H.** Implementation of a novel PCR based method for detecting malaria parasites from naturally infected mosquitoes in Papua New Guinea. *Malar J.* 2009; 8: 182-93.
15. **Singh B, Bobogare A, Singh JC, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA.** A genus- and species-specific nested Polymerase Chain Reaction Malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 682-92.
16. **Da Rocha JA, de Oliveira SB, Póvoa MM, Moreira LA, Krettli AU.** Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78: 872-77.
17. **Póvoa MM, Wirzt RA, Lacerda RN, Miles MA, Warhurst D.** Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, state of Amapá, Amazon region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 179-84.
18. **Magris M, Rubio Y, Menaes C, Villegas L.** Vector bionomics and malaria transmission in the upper Orinoco river, southern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102: 303-11.
19. **Gutiérrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 1117-24.
20. **Instituto Nacional de Salud.** Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública- Sistema de vigilancia en salud pública –SIVIGILA. 2009. Semana Epidemiológica 51.
21. **Gobernación de Córdoba.** Boletín epidemiológico primer trimestre 2010. Consultado el 15 de marzo de

2011. Disponible en: [http://www.cordoba.gov.co/boletin\\_epidemiologico.html](http://www.cordoba.gov.co/boletin_epidemiologico.html)
22. **Roll Back Malaria, World Health Organization.** UNICEF. World Malaria Report. Geneva (Suiza), World Health Organization; 2005. 294 p.
  23. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2007. 226 p.
  24. **Faran M, Linthicum L.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Sys. 1981; 13: 1-81.
  25. **Wilkerson R, Strickman D.** Clave Ilustrada para la Identificación de las hembras de Mosquitos de México y Centroamérica. Secretaria de Salud, Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, México; 1993. 46p.
  26. **Cienfuegos AV, Gómez GF, Cordoba LA, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. Rev. Biomédica (Mex.). 2008; 19: 35-44.
  27. **Cienfuegos AV, Naranjo N, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Evaluation of a PCR-RFLP- ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. Acta Trop. 2011; 118: 128-35.
  28. **Zapata MA, Cienfuegos AV, Quirós O, Quiñones ML, Luckhart S, Correa MM.** Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of ITS sequences. Am J Trop Med Hyg. 2007; 77: 67-72.
  29. **Da Silva-Vasconcelos A, Neves MY, Neves E, Lessa R, da Luz RN, Sibajev A, Tsouris P, Povoá MM, Momen H, Freitas NG.** Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 151-61.
  30. **Rosero DA, Gutiérrez LA, Cienfuegos AV, Jaramillo LM, Correa MM.** Optimización de un procedimiento de extracción de ADN a partir de *Anopheles* spp. Rev Colomb Entomol. 2010; 36: 260-63.
  31. **Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).** EPIDAT. Programa para análisis epidemiológico de datos tabulados, versión 3.1. Dirección Xeral de Saúde Pública da Consellería de Sanidade (Xunta de Galicia), Unidad de Análisis de Salud y Sistemas de Información Sanitaria da Organización Panamericana de la Salud; 2006.
  32. **Olano V, Brochero H, Saenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica. 2001; 21: 402-8.
  33. **Rojas JE, Sojo M, García I.** Estudios sobre formas preadultas y adultas de *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) Gabaldon, 1940, en el área originalmente malárica del estado de Mérida, Venezuela. Rev Cubana Med Trop. 2002; 54: 127-33.
  34. **Rubio Y.** Prevalencia de *Plasmodium* spp. en anofelinos de Venezuela. Talleres. 2009; 12: 79-84.
  35. **Conn JE, Puertas YR, Seawright JA.** A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 1993; 9: 294-301.
  36. **Tadei WP, Thatcher D, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues, IO, Rafael MS.** Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59: 325-35.
  37. **Galardo AK, Arruda M, D Almeida A, Wirtz R, Lounibos L, Zimmerman R.** Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76: 461-69.