

PCR-RFLP de secuencias ITS como método de identificación de especies de anopheles del subgénero nyssorhynchus

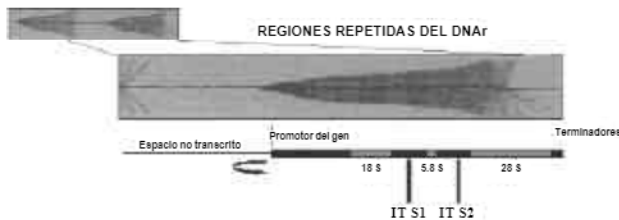
Mario Zapata¹, Andrea Trujillo¹, Olga Agudelo¹, Martha Quiñones², Jake Tu³, Shirley Luckhart³ y Margarita Correa¹

INTRODUCCIÓN:

La malaria constituye uno de los problemas más importantes de salud pública en Colombia. Los vectores son mosquitos del género *Anopheles*; en Colombia están presentes especies del subgénero *Nyssorhynchus*, algunas de ellas importante vectores de malaria, como: *An. albimanus*, *An. darlingi* y *An. nuñeztovari*. Varias especies pertenecientes a este subgénero presentan alta similitud morfológica del adulto, generando dificultad en la identificación taxonómica. En los últimos años se han utilizado marcadores moleculares como los espaciadores internos transcritos (ITS) del DNA ribosomal (DNAr) para examinar variaciones interespecies (ITS2) e intraespecie (ITS1) (1) (Figura N°1).

Figura N° 1

Unidad transcripcional repetida en tandem del DNAr



La importancia de identificar una especie en particular que habita en una zona en forma simpática con otras especies, reside en que cada una de ellas puede presentar niveles muy diferentes de competencia vectora, influenciando directamente el proceso de transmisión de la malaria e indirectamente la toma de decisiones sobre la implementación de estrategias de control por parte de las entidades competentes.

¹ Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Bacteriología y Lab. Clínico, Universidad de Antioquia

² Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia

³ Departamento de Bioquímica, Virginia Polytechnic Institute and State University, U.S.A

Correo Electrónico: mzapata@catios.udea.edu.co - mcorrea@quimbaya.udea.edu.co

OBJETIVO

Diferenciar por PCR-RFLP de ITSs especies de mosquitos *Anopheles* del subgénero *Nyssorhynchus*.

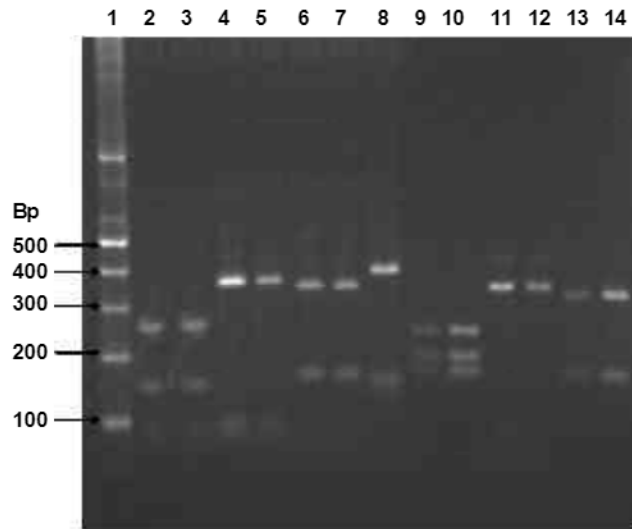
METODOLOGÍA

Se capturaron mosquitos (Nechí-San Pedro de Urabá) y se identificaron con claves taxonómicas (Suárez y cols-1985 y Faran-1980); se amplificaron las secuencias ITS (Beebe y cols. 2000); se realizó RFLP (enzima *AluI*), se visualizaron en gel al 2%.

RESULTADOS

Se procesaron 166 mosquitos: *An. nuñeztovari*-51.6%, *An. darlingi*-41%, *An. rangeli*-3.0%, *An. albimanus*-2.0%, *An. albitarsis* sp.-1.2% y *An. triannulatus*-1.2%. El amplificado de las ITS presentó un tamaño promedio de 500 bp. La PCR-RFLP de ITS2 presentó un patrón de restricción diferente para cada especie analizada (Figura N° 2). La PCR-RFLP de ITS1 de las especies analizadas hasta el momento no mostró variabilidad, es el caso de *An. nuñeztovari* (Figura N° 3).

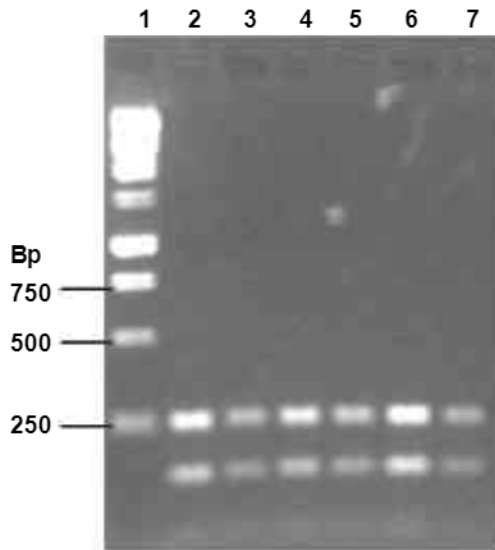
Figura N° 2
PCR-RFLP de ITS2 mosquitos
Anopheles subgénero *Nyssorhynchus*



Gel 2% de agarosa 70 V.

Digestión de ITS2 con enzima de restricción *AluI*, diferencia claramente patrones individuales para cada una de las especies de *Anopheles*. Carril 1: peso molecular; carriles 2 y 3: *An. albitarsis*; carriles 4 y 5: *An. nuñeztovari*, carriles 6 y 7: *An. rangeli*, carril 8: *An. albimanus*; carriles 9 y 10: *An. triannulatus*; carriles 11 y 12: *Anopheles punctimacula* (no *Nyssorhynchus*); carriles 13 y 14: *An. darlingi*.

Figura N° 3
PCR-RFLP de ITS1 *An. nuñeztovari*



Gel de agarosa al 2% - 70 V.

Digestión de ITS1 con enzima de restricción *AluI*, no se observa diferencia en los patrones de la digestión en los mosquitos *Anopheles nuñeztovari*. Carril 1: peso molecular, carriles 2 al 7: *An. nuñeztovari*.

CONCLUSIONES

El tamaño del amplicón de ITS2 (500 bp), está en el rango de lo referido para *An. darlingi* (406bp) en Suramérica (2) y para

An. nuñeztovari (548 bp), *An. oswaldoi* (531 bp) y *An. rangeli* (528 bp) en Colombia (3). La técnica de RFLP de ITS2 permitió identificar especies de mosquitos que presentan una alta similitud morfológica, demostrando ser una herramienta útil para diferenciar especies del subgénero *Nyssorhynchus*. La PCR-RFLP de ITS1 no identificó la presencia de variabilidad en especies como *An. nuñeztovari*.

PALABRAS CLAVE

MALARIA
ANOPHELES SUBGÉNERO NYSSORHYNCHUS
ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS (ITS2- ITS1)

BIBLIOGRAFÍA

1. BEEBE N, COOPER R, FOLEY D. AND ELLIS J. Populations of the south-west Pacific malaria vector *Anopheles farautensis* revealed by ribosomal DNA transcribed spacer polymorphisms. *Heredity* 2000,94: 244-253.
2. MANGUIN S, WILKERSON R, CONN J, RUBIO-PALIS DANOFF-BURG J, and ROBERTS D. 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. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 1999. 60(3): 364-376.
3. RUIZ F.J. Caracterización morfológica y molecular (PCR-RFLP) de algunas especies de *Anopheles Nyssorhynchus* en el departamento del Putumayo. Tesis de Maestría. Universidad de Antioquia. Instituto de Biología. Medellín. 2003; Pg: 10-11.