

ARTÍCULO ORIGINAL

## Utilidad de la morfología de los huevos como un método indirecto para identificar *Anopheles benarrochi* Gabaldón, Cova García & López, *Anopheles oswaldoi* (Peryassu) y *Anopheles rangeli* Gabaldón, Cova García & López, (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia

Dora Amparo Estrada <sup>1</sup>, Martha L. Quiñones <sup>1</sup>, Diana Maria Sierra <sup>1</sup>, David A. Calle <sup>1</sup>,  
Fredy Ruiz <sup>1</sup>, Holmes F. Erazo <sup>2</sup>, Yvonne-Marie Linton <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Departamento Administrativo de Salud, DASALUD, Putumayo, Colombia.

<sup>3</sup> The Mosquitoes Programme and Biomedical Sciences Theme, Department of Entomology, The Natural History Museum, London, England.

La identificación correcta de las hembras es esencial para el éxito de cualquier estudio de epidemiología, resistencia a insecticidas o de control de vectores. En el departamento del Putumayo, en el sur de Colombia, la transmisión de malaria continúa siendo un problema, a pesar de la ausencia de los vectores principales de Latinoamérica (*Anopheles darlingi* Root, *Anopheles nuneztovari* Gabaldón, *Anopheles albimanus* Wideman, *Anopheles trinkae* Faran) en esta región. Se recolectaron, con cebo humano, hembras de *Anopheles* y se encontró una variante morfológica de *Anopheles benarrochi*, que en su estadio adulto fácilmente se confunde con *Anopheles oswaldoi*. La identificación de hembras de *Anopheles*, particularmente del subgénero *Nyssorhynchus*, es en general notoriamente difícil debido a la superposición de caracteres morfológicos en el estadio adulto; por tanto, las colecciones deben estar ligadas a la cría de material asociado para identificar correctamente las especies. Esto requiere tiempo y es difícil de obtener en muchas ocasiones. Se presenta un método indirecto de identificación de las especies *A. benarrochi*, *A. oswaldoi* y *Anopheles rangeli* del sur de Colombia usando la morfología de los huevos de hembras silvestres. Los huevos de *A. rangeli* y *A. benarrochi* se diferencian por la corona anterior, la cual es apical en *A. rangeli* y con paredes altas, mientras que en *A. benarrochi* es ventral y con paredes más cortas. Esta corona está ausente en *A. oswaldoi*. Estas diferencias fueron obvias incluso bajo un microscopio de luz, lo que hace posible una identificación correcta de estas especies en condiciones de campo. Se muestra cómo la observación de la morfología de los huevos puede permitir la determinación taxonómica correcta, aunque indirecta, de estas tres especies de *Nyssorhynchus* encontradas en el sur de Colombia, el cual puede ser útil también en otras regiones de Latinoamérica, en donde se encuentre la variante morfológica de *A. benarrochi* en simpatria con *A. oswaldoi*.

**Palabras clave:** *Nyssorhynchus*, huevos, *Anopheles*, Colombia, microscopía electrónica.

**Egg morphology as an indirect method to identify *Anopheles benarrochi*, *Anopheles oswaldoi* and *Anopheles rangeli* (Diptera: Culicidae)**

In the Department of Putumayo in southern Colombia, malaria transmission has continued in the absence of the 4 traditional Latin American vector species - *Anopheles darlingi*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles albimanus* or *Anopheles trinkae*. Human bait collections yielded *Anopheles* mosquitoes and a morphological variant of *Anopheles benarrochi*, the adult females of which can easily be misidentified as *Anopheles oswaldoi*. Species identification of females of *Anopheles* in the subgenus *Nyssorhynchus* is generally difficult due to overlapping morphological characters; therefore, progeny of field collected females were link-reared to assess species identity. Herein a robust method is presented to identify the species *Anopheles*

*benarrochi*, *Anopheles oswaldoi* and *Anopheles rangeli* from southern Colombia, using the morphology of the eggs induced from wild-caught females. Eggs of *A. rangeli* and *A. benarrochi* were differentiated on the basis of the anterior crown. In *A. rangeli*, this feature is positioned apically with high walls. In *A. benarrochi*, anterior crown is positioned more ventrally with comparatively shorter walls. No crown is present in *A. oswaldoi*. These differences are clear with the aid of a dissecting microscope and make accurate species determination possible even in field conditions. Egg morphology is shown to be an accurate, albeit indirect, method for the taxonomic determination for the three southern Colombian species and may also be useful in other regions of Latin America where the morphological variant of *A. benarrochi* is sympatric with *A. oswaldoi*.

**Key words:** *Nyssorhynchus*, eggs, *Anopheles*, Colombia, scanning electron microscopy.

Los estudios más completos sobre los mosquitos *Anopheles* del Neotrópico pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus* se reportan en Faran (1), Faran & Linthicum (2) y Linthicum (3). Estas publicaciones contienen las claves taxonómicas más usadas. Algunas especies de este subgénero muestran una variación intraespecífica y superposición interespecífica de caracteres morfológicos en el estadio adulto, principalmente hembras, y en la pupa, que hacen difícil su identificación usando estas claves y se pueden producir identificaciones erróneas (4). Faran (1) menciona que las genitales masculinas y la quetotaxia de las larvas ofrecen las características más confiables para una correcta determinación de estas especies. Por esta razón, es importante basar la identificación de especies en estados de vida asociados, pero estas crías demandan tiempo y algunas veces son difíciles de realizar en condiciones de campo.

En estudios epidemiológicos y de control de vectores es indispensable realizar la identificación de una forma rápida y correcta, de hembras de mosquitos antropofílicos. Es justamente en este estadio en el que se hace difícil una correcta identificación, principalmente de hembras del subgénero *Nyssorhynchus*. A pesar de que muchas especies se han identificado con éxito utilizando la morfología de sus huevos, incluyendo miembros de complejos de especies como el

complejo *Anopheles maculipennis* Meigen (5), los estudios de Faran (1), Faran & Linthicum (2) y Linthicum (3) no involucran los caracteres de los huevos como herramientas para la identificación de especies. La observación de la morfología de los huevos de hembras silvestres que ovipositan en el laboratorio, junto con la morfología de las madres, podrían ser herramientas útiles para una correcta identificación de especies de *Nyssorhynchus*.

El potencial de la microscopía electrónica de barrido (MEB) para elucidar caracteres diagnóstico en huevos de *Anopheles* fue reconocido por Hinton (6). La MEB se ha convertido, cada vez con mayor frecuencia, en una herramienta importante al generar información de las estructuras de los huevos. Los estudios detallados de las células coriónicas, densidad y estructura de los tubérculos de la superficie ventral y detalles de los flotadores por medio de la MEB permiten el análisis de características ultraestructurales para poder hacer comparaciones entre especies y poblaciones (7). Utilizando la MEB, se han descrito los huevos de 12 de las 16 especies de la Sección Albimanus del subgénero *Nyssorhynchus* (8), estas especies son: *Anopheles albimanus* Wiedemann (9); *Anopheles aquasalis* Curry (10, 11), *Anopheles benarrochi* Gabaldón, Cova García & López, *Anopheles dunhami* Causey, *Anopheles konderi* Galvao & Damasceno, *Anopheles oswaldoi* (Peryassu), *Anopheles nuneztovari* Gabaldón (12); *Anopheles rangeli* Gabaldón, Cova Garcia & Lopez y *Anopheles trinkae* Faran (como *A. dunhami*) (13); *Anopheles rondoni* (Neiva & Pinto) (14); *Anopheles strodei* Root, *Anopheles triannulatus* Neiva & Pinto (7), *Anopheles galvaoi* Causey, Deane & Deane y *Anopheles evansae* (Brethes) (15).

Correspondencia:

Martha L. Quiñones, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, apartado aéreo 1226, Medellín, Colombia.  
Fax: (+574) 571 6675.  
martqp@yahoo.com

Recibido: 09/05/03; aceptado: 12/09/03

Faran (1) y Faran & Linthicum (2) reportaron *A. evansae* con una distribución restringida a Brasil, Bolivia y Argentina. Sin embargo, hay reportes de *A. evansae* en varias localidades de Colombia recolectados en cebo humano o en trampa Shannon (16-20). En el departamento del Putumayo, *A. evansae* y *A. rangeli* se han reportado como las especies más antropofílicas (21), junto con *A. oswaldoi* (22). Usando las claves de Faran (1) y Faran & Linthicum (2), algunos adultos hembras de Putumayo concuerdan con las descripciones de adultos hembras de *A. evansae*, pero difieren en otros estadios (4). En esta región se encontró una variante morfológica de *A. benarrochi*, la cual en su estadio adulto es similar a las descripciones de las hembras de *A. evansae* y probablemente los registros de *A. evansae* de Putumayo corresponden realmente a *A. benarrochi*. Algunos ejemplares de *A. benarrochi* en Putumayo se pueden confundir también con *A. oswaldoi* (4). La identidad de los especímenes identificados como *A. evansae* procedente de otras áreas de Colombia generan dudas ya que podrían corresponder también a esta variante morfológica de *A. benarrochi*.

En una revisión llevada a cabo por Ferro (16) y en reportes internos del antiguo Servicio de Erradicación de Malaria y unidades locales de salud de Putumayo, *A. evansae* (como *Anopheles noroestensis*) se reporta como la especie responsable de transmisión de malaria en Putumayo. Sin embargo, esto se ha basado solamente en su alta frecuencia de picaduras a humanos, sin evidencia de su infectividad natural con *Plasmodium*. Los vectores tradicionales de malaria en Latinoamérica no se han reportado en Putumayo. *A. darlingi* sólo se registra en el municipio de Puerto Leguizamo. *A. trinkae*, quien se ha incriminado como vector en un área vecina al Putumayo, en Perú (23), no se ha reportado en Putumayo. La presencia de *A. nuneztovari* se reporta en 1960, pero no hay reportes después de ese año. *A. nuneztovari* es un vector reconocido de malaria en Colombia (24), Perú (23) y Venezuela (25,26). Dadas las dificultades de diferenciar hembras adultas de *Nyssorhynchus* (1), particularmente entre *A. trinkae*, *A. rangeli*, *A. oswaldoi*, *A. evansae*, *A. nuneztovari*, especial-

mente, el morfotipo II descrito en Venezuela (27), y la variante morfológica de *A. benarrochi*, se podría pensar que especies vectoras como *A. nuneztovari* o *A. trinkae* pudieran estar presentes en Putumayo y debido a la dificultad de discriminar las especies del subgénero *Nyssorhynchus* a partir de hembras, estuvieran erróneamente identificadas. Para incriminar las especies responsables de la transmisión en Putumayo es esencial primero identificar correctamente las especies antropofílicas de la región.

Este estudio se realizó para evaluar si las características de los huevos podían ser utilizadas para facilitar una identificación acertada de hembras silvestres de las especies *A. benarrochi* y *A. oswaldoi*, principalmente. Se incluyó también *A. rangeli* por hacer parte de las especies con más antropofilia en Putumayo.

### Metodología

Se recolectaron hembras de *Anopheles* con cebo humano en las localidades de Lisberia y La Manuela del municipio de Puerto Asís, departamento de Putumayo, entre febrero de 1999 y julio de 2001. Las hembras se alimentaron con sangre colocándolas sobre ratón o curí y se transportaron vivas al Laboratorio de Entomología del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia en vasos de icopor. Sobre cada vaso se colocó una solución de glucosa al 5% y se mantuvieron en el insectario por 2 o 3 días antes de inducir la oviposición. Para la inducción de la postura, se procedió a adormecer cada hembra colocándola dentro de un frasco que contenía en el fondo una mota de algodón con acetato de etilo. Cada hembra se colocó sobre agua destilada en un pequeño vaso de plástico después de remover con pinzas un ala y una pata posterior. Cuarenta y ocho horas después de la oviposición, se colocaron aproximadamente 20 huevos por hembra en glutaraldehído al 2% y se guardaron a 5°C. El resto de los huevos de cada vaso fue criado hasta adulto. Las pieles asociadas de larva y pupa se guardaron en etanol al 80% y el respectivo adulto se montó en alfiler para identificación taxonómica. También se realizaron montajes de genitalias masculinas. La identificación de la

especie se realizó observando la morfología de los huevos y se confirmó examinando las pieles de larva, pupa, adulto y genitalia masculina de la progenie de la misma familia, según las descripciones y clave de Faran (1). Además, se realizó una determinación de especies de cada familia basado en similitudes de las secuencias de ITS2 con secuencias disponibles en el GenBank (datos no mostrados).

Para microscopía electrónica y obtención de medidas detalladas de las características de los huevos se seleccionaron muestras de 5 familias de cada especie, con la excepción de *A. oswaldoi* de los cuales sólo dos familias se encontraron en condiciones lo suficientemente buenas para ser fotografiadas. Los huevos destinados para fotografía se deshidrataron en gradientes de alcohol de 30% al 100%, se llevaron a secado de punto crítico con CO<sub>2</sub> y se recubrieron con oropaladio. Los huevos se observaron en un microscopio electrónico Hitachi S-510 del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia. Algunas muestras adicionales se procesaron y examinaron en el Museo de Historia Natural de Londres.

## Resultados

Con base en la morfología de los huevos se identificaron tres especies: *A. rangeli* (38 familias), *A. oswaldoi* (35 familias) y *A. benarrochi* (268 familias). Estas tres especies presentan huevos con características tan diferentes entre ellas, que facilitaron notablemente la identificación, principalmente entre *A. benarrochi* y *A. oswaldoi*. Para la observación de las características de los huevos fue suficiente un microscopio de luz, lo que es de gran importancia y utilidad práctica. Es necesario resaltar que fue necesario iluminar el campo por encima, colocando una lámpara con la luz hacia el portaobjetos y disminuir la intensidad de la luz en la base del microscopio.

Las características por las que se pudieron diferenciar los huevos de estas tres especies fueron: en *A. rangeli* una característica diagnóstica es la presencia de una corona circular con paredes altas en la terminación anterior del huevo. La morfología de los huevos de *A. rangeli* de Putumayo (figura 1A) coincide con las

descripciones para esta especie de Linley & Lounibos (13).

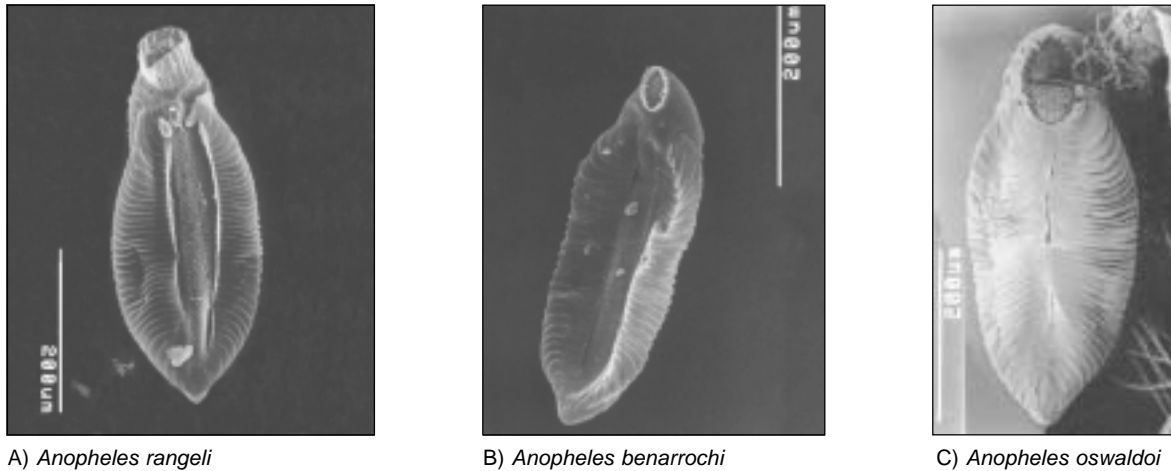
Los huevos de *A. benarrochi* (figura 1B) presentan similarmente una corona circular, pero en posición ventral y de paredes más cortas que los huevos de *A. rangeli*. Esta característica junto con la forma de las células dorsales, las cuales se muestran agrupadas y perforadas con poros, distinguen a *A. benarrochi* de otras especies de *Nyssorhynchus*. La morfología de los huevos de *A. benarrochi* coincide con las descripciones de Lounibos *et al.* (7).

Los huevos de *A. oswaldoi* se caracterizan por presentar un borde pequeño a lo largo de la parte interna de los flotadores como se muestra en la figura 1C, no presentan corona, característica que permite diferenciar *A. oswaldoi* de *A. rangeli* y *A. benarrochi*. Los huevos de *A. oswaldoi* coincidieron con la descripción de Lounibos *et al.* (7).

En el cuadro 1 se muestran algunas mediciones de los huevos, en donde se evidencia la ausencia de corona de *A. oswaldoi*, que permite diferenciar los huevos de *A. oswaldoi* de los huevos de *A. rangeli* y *A. benarrochi*. Entre estas dos últimas especies, tanto el ancho como la altura de la pared de la corona anterior permiten su separación.

## Discusión

En estudios epidemiológicos o en evaluaciones de métodos de control de malaria, es necesario identificar las especies de *Anopheles* correctamente. En situaciones en donde la identificación de hembras de *Anopheles* no es fácil, como es el caso de algunas de las especies del subgénero *Nyssorhynchus*, esta identificación puede realizarse indirectamente permitiendo que las hembras realicen su ovipostura y examinando la morfología de los huevos. Este estudio muestra que las especies *A. rangeli*, *A. oswaldoi* y la variante morfológica de *A. benarrochi* en el sur de Colombia (4) se pueden identificar claramente basados en la morfología de los huevos. Este método puede ser muy útil debido a la gran variabilidad interespecífica y superposición de caracteres entre *A. benarrochi* y *A. oswaldoi* en sus estadios adultos (4). El personal de las unidades locales de salud de entomología puede



**Figura 1.** Huevos de: A) *Anopheles rangeli*, B) *Anopheles benarrochi* y C) *Anopheles oswaldoi* de hembras recolectadas picando humanos en el departamento de Putumayo, Colombia.

**Cuadro 1.** Comparación de los promedios y rangos de las características de los huevos de *Anopheles rangeli*, *Anopheles benarrochi* y *Anopheles oswaldoi*. Medidas en micras (µ).

Características	n	<i>A. rangeli</i>	n	<i>A. benarrochi</i>	n	<i>A. oswaldoi</i>
Longitud (L)	95	476,90 ± 2,40	80	463,30 ± 2,60	2	404,70 ± 18,7
Ancho promedio (A)	95	147,70 ± 1,60	80	138,60 ± 1,75	2	158,80 ± 19,2
Razón L/A	95	3,30 ± 0,05	80	3,40 ± 0,05	2	2,50 ± 0,19
Ancho anterior	93	138,80 ± 2,50	80	130,10 ± 2,70	1	128,40
Ancho posterior	93	53,10 ± 1,60	80	51,40 ± 1,70	1	41,20
Longitud de los flotadores	93	358,50 ± 4,80	80	358,10 ± 5,30	2	340,80 ± 1,1
% de los flotadores	92	75,40 ± 0,90	80	77,30 ± 1,10	2	84,40 ± 4,1
No. surcos en los flotadores	92	35,20 ± 0,30	77	32,80 ± 0,40	2	35,00 ± 1
Ancho de los surcos	92	10,60 ± 0,10	77	10,90 ± 0,10	2	9,70 ± 0,03
Distancia entre los flotadores y la corona anterior	84	40,40 ± 1,70	64	40,70 ± 1,90		NA
Ancho de la corona anterior	90	52,00 ± 1,40	68	35,10 ± 1,60		NA
Altura de la pared de la corona anterior	92	36,20 ± 0,60	68	15,50 ± 0,70		NA

(NA: no aplica por no presentar corona anterior)

implementar las colecciones de mosquitos y la posterior obtención de sus huevos, particularmente en regiones en donde se reporta la presencia de *A. evansae*, *A. oswaldoi* o *A. benarrochi* para corroborar las determinaciones realizadas basadas solamente en la morfología de hembras adultas. La posibilidad de observar las características en los huevos por medio de un microscopio de luz facilita una identificación correcta de estas especies en condiciones de campo. Aunque se han publicado pocas claves para huevos de *Anopheles*, las existentes proveen suficientes ilustraciones y descripciones para

permitir su uso por funcionarios de salud en campo (6, 28). Sería deseable, sin embargo, elaborar una clave para huevos de *Anopheles* de Colombia.

En algunas especies del subgénero *Nyssorhynchus*, la morfología de los huevos no permite diferenciar entre especies, debido a que algunas especies presentan un alto nivel de variabilidad morfológica en este estadio, o los huevos presentan similitudes con los de otras especies bajo el microscopio de luz. Por ejemplo, para la especie *A. strodei*, se ha reportado la existencia de variación intraespecífica (29) en la morfología de los huevos, y huevos de varias especies pueden

ser indistinguibles al observarlos en un estereoscopio o microscopio de luz, como son las especies *A. nuneztovari* y *A. albimanus*, los cuales presentan una morfología similar, o *A. oswaldoi* y *A. konderi*, entre otras. Por esta razón, Delgado & Rubio-Palis (27) expresan la poca confiabilidad al usar solamente características de los huevos para identificación de especies. Sin embargo, en este estudio la observación de los huevos permitió realizar una identificación rápida y corroborar las identificaciones de las hembras aisladas para cría de isofamilias de las especies *A. rangeli*, *A. oswaldoi* y *A. benarrochi* de Putumayo. La morfología de los huevos, junto con las características de sus estadios asociados: larva, pupa, genitalia masculina y adulto, permitieron descartar la presencia de otras especies de *Nyssorhynchus*, de las cuales se sospechaba o se había mencionado su presencia en esta región en reportes internos de DASALUD Putumayo entre las que se cuenta *A. nuneztovari*, *A. trinkae* y *A. evansae*. Cabe anotar que en 3 años de recolecciones no se encontró evidencia de su presencia en Putumayo. Estas especies presentan características en todos sus estadios que las diferenciarían de *A. benarrochi*, *A. oswaldoi* y *A. rangeli* (1,2). Particularmente en los huevos, las características más notorias y visibles bajo el microscopio para diferenciar *A. trinkae* de las especies antes mencionadas son el tamaño de los flotadores; en *A. trinkae* son más grandes que en *A. rangeli*, la presencia de una corona, similar a la de *A. rangeli*, pero sobresaliendo el ápice del huevo por el centro de la corona. Una descripción detallada de la morfología de los huevos de *A. rangeli* y *A. trinkae* (como *A. dunhami*) la realizaron Linley y Lounibos (13). *A. nuneztovari* se podría confundir en su estadio adulto con *A. trinkae*, *A. benarrochi* o *A. rangeli* (1,2); sin embargo, sus huevos presentan diferencias que permiten una fácil separación como es la ausencia de la corona en los huevos de *A. nuneztovari* mientras que *A. trinkae*, *A. benarrochi* y *A. rangeli* presentan esta corona. Una completa descripción de los huevos de *A. nuneztovari* la realizó Linley *et al.* (12). Aunque se ha descrito una variabilidad en las células coriónicas en huevos de *A. nuneztovari*, esta variabilidad es notable sólo bajo microscopía electrónica (12). Los adultos de

*A. evansae* se pueden confundir con la variante de *A. benarrochi* encontrada en Putumayo, similarmente los huevos de estas dos especies permiten su fácil separación; la diferencia más evidente es la presencia de la corona en *A. benarrochi* y su ausencia en *A. evansae*, entre otras diferencias en los estadios inmaduros y genitalia masculina. Una reciente descripción de los huevos de *A. evansae* la realizó Salum *et al.* (15).

*A. benarrochi* se menciona con una amplia distribución no sólo en Colombia, sino también en países vecinos como Perú y Brasil (1,30). En Colombia se registra principalmente en la región de la Orinoquia de los Llanos Orientales de Colombia (1,31). Sin embargo, esta especie no se menciona en reportes locales recientes de las diferentes secretarías de salud. Según las descripciones de Faran (1), las hembras adultas de *A. benarrochi* son muy similares a las de *A. aquasalis* y *A. strodei*. Inclusive en la descripción original de esta especie Gabaldón *et al.* (32) mencionan que los adultos hembras son imposibles de distinguir de *A. strodei*, *A. nuneztovari* o *A. rangeli*. El hallazgo de una variante morfológica de *A. benarrochi* que hace que sus hembras sean indistinguibles de *A. oswaldoi* en Putumayo, utilizando las claves disponibles, fue una observación interesante que dificulta aún más su determinación taxonómica a partir de hembras. Al parecer, las claves en uso para el subgénero *Nyssorhynchus* (1,2,33) no permiten una correcta identificación de los adultos-hembras de esta especie en el sur de Colombia, a menos que se disponga de estadios asociados. Debido a esta dificultad con las claves, es probable que *A. benarrochi* esté siendo incorrectamente identificada en otras áreas del país y países vecinos. La identificación de *A. benarrochi* en Putumayo se realizó con base en la morfología de los huevos y las características de sus larvas, pupas y genitalias masculinas (4) así como por secuencias de ADN (datos no mostrados) de progenies de isofamilias. Sin embargo, es difícil realizar todas estas actividades en las diferentes regiones del país y es necesario disponer de una alternativa más fácil para la correcta identificación de las especies, particularmente en regiones donde se reporta la presencia de *A. evansae* y *A.*

*oswaldoi*, los cuales podrían corresponder a *A. benarrochi*.

En este trabajo se muestra la utilidad de usar la morfología de los huevos, obtenidos a partir de la recolección de hembras silvestres individualizadas, como un método relativamente sencillo, el cual puede ser realizado en el campo y que permite identificar o confirmar la identificación de algunas especies de *Anopheles* en su estadio adulto, particularmente para identificar *A. benarrochi* en regiones donde se registra *A. evansae* o *A. oswaldoi*. Este método puede permitir una determinación taxonómica correcta, aunque indirecta, de *A. benarrochi*, *A. oswaldoi* y *A. rangeli* en el sur de Colombia, el cual puede ser útil también en otras regiones de Latinoamérica, en donde se encuentre la variante morfológica de *A. benarrochi* en simpatria con *A. oswaldoi*.

#### Agradecimientos

Este estudio fue financiado por The Wellcome Trust, Colciencias (Cod. 1115-04-460-98) y el CODI de la Universidad de Antioquia. Expresamos nuestros agradecimientos a Albeiro Acevedo del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia por la colaboración en el procesamiento de las muestras para MEB y las fotografías, a Theresa Howard del Museo de Historia Natural (NHM) de Londres por su asistencia con las fotografías por MEB de *A. oswaldoi* y a Ralph Harbach (NHM) por la invaluable ayuda en la preparación y edición del manuscrito.

#### Referencias

1. **Faran ME.** Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contr Am Entom Inst* 1980;15:1-214.
2. **Faran ME, Linthicum KJ.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 1981;13:1-18.
3. **Linthicum KJ.** A revision of the Argyritarsis Section of the Subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 1988;20:98-270.
4. **Quiñones ML, Harbach RE, Calle DA, Ruiz F, Erazo HF, Linton Y-M.** Variante morfológica de adultos hembras de *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomédica* 2001;21:351-9.
5. **White GB.** Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. *Mosq Syst* 1978;10:13-44.
6. **Hinton HE.** Observations on the biology and taxonomy of the eggs of *Anopheles* mosquitoes. *Bull Ent Res* 1968;57:495-508.
7. **Lounibos LP, Duzak D, Linley JR.** Comparative egg morphology of six species of the *Albimanus* section of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *J Med Ent* 1997;34:136-55.
8. **Harbach RE.** Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull Ent Res* 1994;84:331-42.
9. **Rodríguez MH, Chávez B, Orozco A, Loyola EG, Martínez-Palomo A.** Scanning electron microscopic observations of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) eggs. *J Med Ent* 1992;29:400-6.
10. **Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo-Machado M, Vale BS, Lenzi HL, Galler R, Lima JBP.** Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 1999;45:701-8.
11. **Maldonado V, Finol HJ, Navarro JC.** *A. aquasalis* eggs from two localities compared by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92:487-91.
12. **Linley JR, Lounibos LP, Conn J, Duzak D, Nishimura N.** A description and morphometric comparison of eggs from eight geographic populations of the South American malaria vector *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc* 1996;12:275-92.
13. **Linley JR, Lounibos LP.** The eggs of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *rangeli* and *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dunhami* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 1993;25:157-69.
14. **Forattini OP, Sallum AM, Bergo ES, Flores DC.** Ultrastructure of eggs of *Anopheles rondoni*, *Anopheles lutzii* and *Anopheles parvus*, three species of the subgenus *Nyssorhynchus*. *J Am Mosq Control Assoc* 1998;4:256-65.
15. **Sallum MA, Bergo ES, Forattini OP, Flores DC.** The eggs of *Anopheles galvaoi* and *Anopheles evansae*, two species of the subgenus *Nyssorhynchus*. *J Am Mosq Control Assoc* 2002;18:10-15.
16. **Ferro CA.** Revisión de los recursos aplicables a la lucha contra el Paludismo. *Rev Esc Nac Salud Pública* 1979;5:11-8.
17. **Quiñones ML, Suárez MF, Fleming GA.** Distribución y biología de los anofelinos de la Costa Pacífica de Colombia. *Col Médica* 1987;18:19-24.
18. **Quiñones ML, Villarreal LI, Suárez MF.** Distribution and biting behaviour of *Anopheles* species in Casanare, Colombia. *Am Mosq Control Assoc* 1992;8:305-6.
19. **Herrera S, Suárez MF, Sánchez GI, Quiñones ML, Herrera M.** Uso de la técnica inmuno-radiométrica

- (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoítos de *Plasmodium*. Col Médica 1987; 18:2-6.
20. **Pérez L, Suárez M, Murcia L, de la Hoz F, Olano VA, Brochero H, Toro P.** La malaria en el Amazonas: conocimientos, practicas, prevalencia de parasitemia y evaluación entomológica en mayo de 1997. Biomédica 1999;19:93-102.
  21. **Suárez MF, Quiñones ML, Wirtz RA.** *Anopheles rangeli*: a suspected vector of *Plasmodium vivax* in southern Colombia. The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, New Orleans; 1999. p.158.
  22. **Quiñones ML, Linton Y-M, Harbach RE, Estrada DA, Erazo HF, Calle DA, Ruiz JF.** Malaria vector species in southern Colombia: species determination and natural infectivity. XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. 20-25 August, Cartagena de India, Colombia; 2000. p.108.
  23. **Hayes J, Calderon 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.
  24. **Elliot R.** The influence of vector behaviour on malaria transmission. Am J Trop Med Hyg 1972;21:755-63.
  25. **Pintos P, Sabril López V.** Esporozoítos en *Anopheles (N.) nuñeztovari* en área de malaria refractaria. Bol Dir Malariol San Amb 1968;88:375-81.
  26. **Rubio-Palis Y, Curtis CF.** Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. Med Vet Entomol 1992;6:375-81.
  27. **Delgado N, Rubio-Palis Y.** Morphometric characterisation of the malaria vector *Anopheles nuñeztovari* (Diptera: Culicidae) from Western Venezuela. Mosq Syst 1992;24:231-41.
  28. **Causey OR, Deane LM, Deane, MP.** An illustrated key to the eggs of thirty species of Brazilian anophelines with several new descriptions. Am J Hyg 1944;39:1-7.
  29. **Cova García P, Sutil E.** Claves gráficas para la clasificación de anofelinos de Venezuela. Caracas: División de Endemias Rurales, Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social; 1977. p.1-92.
  30. **Sallum MAM, Bergo ES, Forattini OP.** First record of *Anopheles benarrochi* Gabaldón, Cova Garcia & Lopez from the State of Sao Paulo, Southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997;92:233-4.
  31. **Rengifo S, de Zulueta J.** Five years' observations of rural malaria in eastern Colombia. Am J Trop Med Hyg 1952;1:598-611.
  32. **Gabaldón A, Cova-García P, López JA.** *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi*, una nueva especie de la subserie Triannulatus. Publ Div Malariol 1941;7: 3-24.
  33. **Suárez MF, Quiñones M, Fleming GA Robayo M.** Guía introductoria a la morfología de *Anopheles* y clave para determinación de las principales especies de Colombia. Bogotá, Colombia: Dirección de Campañas Directas, Ministerio de Salud; 1988.