

**Hospederos de *Anopheles* e indicadores entomológicos relacionados con la transmisión de *Plasmodium* en zonas endémicas del Bajo Cauca y Pacífico colombiano**

**Estefani Andrea Piedrahita Hernández**

**Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Tutora**

**Margarita M. Correa O, MSc. PhD.**

**Miembros comité tutorial**

**Lina A. Gutiérrez Builes, PhD.**

**Nelson J. Naranjo, PhD.**

**Giovan F. Gómez García, PhD.**

**Universidad de Antioquia**

**Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas**

**Medellín**

**2021**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN EN ESPAÑOL.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN EN INGLES .....</b>	<b>11</b>
<b>MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>13</b>
<b>Malaria en Colombia.....</b>	<b>13</b>
<b>Especies de <i>Anopheles</i> en Colombia.....</b>	<b>13</b>
<b>Abundancia y comportamiento de picadura de los vectores principales .....</b>	<b>14</b>
<b>Infección natural de especies de <i>Anopheles</i> por <i>Plasmodium</i> spp.....</b>	<b>16</b>
<b>Métodos de detección de <i>Plasmodium</i> en especies de <i>Anopheles</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>Alimentación con sangre de las hembras de <i>Anopheles</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>Métodos para la identificación de hospederos como fuente sangre para las especies de <i>Anopheles</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>Hospederos que constituyen la fuente de sangre para los mosquitos <i>Anopheles</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>Estrategias de control vectorial.....</b>	<b>19</b>
<b>Componentes de la capacidad vectorial.....</b>	<b>20</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
Objetivo General.....	24
Objetivos Específicos.....	24
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>24</b>
Área de estudio y recolecta de especímenes .....	24
Censo de humanos y animales presentes en los sitios de muestreo .....	26
Procesamiento de especímenes en campo .....	27
Identificación de especies de <i>Anopheles</i> .....	27
Extracción de ADN del intestino y el tórax de los especímenes .....	28
Detección de los hospederos vertebrados mamíferos que son fuentes de alimentación para las especies de <i>Anopheles</i> basada en la amplificación del gen <i>CYB</i> .....	28
Detección de los hospederos aves que son fuentes de alimentación para las especies de <i>Anopheles</i> basada en la amplificación del gen <i>CYB</i> .....	29
Detección de los hospederos vertebrados mamíferos que son fuentes de alimentación para las especies de <i>Anopheles</i> basada en la amplificación del gen <i>COI</i> .....	29
Análisis de las secuencias del gen <i>COI</i> usadas para la identificación de los hospederos que son fuentes de alimentación para las especies de <i>Anopheles</i> .....	30
Detección de infección natural por parásitos <i>Plasmodium</i> en <i>Anopheles</i> .....	30
Estimación de índices entomológicos .....	32
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
Abundancia y composición de las especies de <i>Anopheles</i> recolectadas en campo .....	32
Registro de humanos y animales presentes en las cuatro localidades de estudio .....	34
Abundancia de hembras de <i>Anopheles</i> recolectadas en reposo .....	35
Hospederos que son fuentes de alimentación para las hembras de <i>Anopheles</i> .....	36
Índices que determinan la elección de un hospedero como fuente de alimentación de sangre .....	39
Comportamiento de picadura de las especies <i>Anopheles</i> .....	40

<b>Infección natural por <i>Plasmodium</i> en especies de <i>Anopheles</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>LIMITACIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>48</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>49</b>
<b>GRADO DE ORIGINALIDAD.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**BAC:** Bajo Cauca Antioqueño.

**BLAST:** Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (por la sigla en inglés, Basic Local Alignment Search Tool).

**BOLD:** Plataforma web específicamente para los códigos de barras de ADN (por su sigla en inglés, Barcode of Life Data System).

**CBEIH- SIU:** Comité de Bioética de Investigaciones Humanas. Sede de Investigación Universitaria.

**COI:** Citocromo c oxidasa subunidad I (por la sigla en inglés, Cytochrome C Oxidase Subunit I).

**CH:** Cebo humano

**COXIII:** Citocromo c oxidasa subunidad III (por la sigla en inglés, Cytochrome C Oxidase Subunit III).

**dNTP:** Desoxirribonucleótidos trifosfato (por la sigla en inglés, Deoxyribose Nucleoside Triphosphate).

**FIER:** Fumigación de Interiores con Insecticidas de Efecto Residual

**INS:** Instituto Nacional de Salud.

**ISH:** Índice de sangre humana.

**IF:** Índice de forraje.

**ITS2:** Espaciador transcrito interno 2 (por la sigla en inglés, Internal Transcribed Spacer 2).

**MT-CYB:** Citocromo b codificado mitocondrialmente (por la sigla en inglés, Mitochondrially Encoded Cytochrome B).

**MUSCLE:** Alineamiento múltiple de secuencias por expectativa logarítmica (por la sigla en inglés, Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation).

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PAC:** Pacífico colombiano.

**Pb:** Pares de países.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (por la sigla en inglés, polymerase chain reaction).

**RFLP:** Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (por la sigla en inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism).

**TI:** Tasa de infección.

**TIE:** Tasa de inoculación entomológica.

**TILD:** Toldillos Impregnados con Insecticidas de Larga Duración.

**TPH:** Tasa de picadura al humano.

## LISTA DE TABLAS

**Pág**

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar por PCR, la región del gen MT- <i>CYB</i> y <i>COI</i> para vertebrados y 18S rRNA y <i>COXIII</i> para <i>Plasmodium</i> .....	31
Tabla 2. Abundancia, composición y parámetros entomológicos de las especies <i>Anopheles</i> recolectadas en cuatro localidades endémicas para malaria en Colombia, por método de malla polisombra y cebo humano.....	33
Tabla 3. Hospederos identificados como fuentes de sangre para las hembras de <i>Anopheles</i> de acuerdo a la amplificación de <i>CYB</i> y secuenciación de <i>COI</i> .....	38
Tabla 4. Índice de sangre humana e índice de forraje para las especies de <i>Anopheles</i> recolectadas en cuatro localidades del Bajo Cauca y Pacífico colombiano.....	39

## LISTA DE FIGURAS

pág

Figura 1. Mapa de sitios de muestreo de especímenes <i>Anopheles</i> en Colombia.....	26
Figura 2. Proporción de humanos y animales vertebrados registrados en los sitios de recolecta .....	34
Figura 3. Comportamiento en reposo de hembras <i>Anopheles</i> .....	35
Figura 4. Hospederos mamíferos fuente de alimentación con sangre para las hembras de <i>Anopheles</i> detectadas por PCR-CYB.....	36
Figura 5. Hospederos mamíferos fuente de alimentación con sangre para las hembras de <i>Anopheles</i> detectadas por PCR-COI .....	37
Figura 6. Red de interacción cuantitativa de los hospederos de las hembras de <i>Anopheles</i> .....	38
Figura 7. Actividad y hora de picadura de especímenes <i>An. nuneztovari</i> y <i>An. darlingi</i> recolectados en las localidades .....	41
Figura 8. Infección natural por <i>Plasmodium</i> spp. en <i>An. nuneztovari</i> .....	42

## LISTA DE ANEXOS

**pág**

Anexo A. Protocolo de amplificación por PCR para la región <i>MT-CYB</i> de hospederos vertebrados mamíferos.....	67
Anexo B. Protocolo de amplificación por PCR para la región <i>MT-CYB</i> de hospederos vertebrados aves.....	68
Anexo C. Protocolo de amplificación por PCR para la región <i>COI</i> de hospederos vertebrados mamíferos.....	69
Anexo D. Número de humanos y animales presentes en los sitios de recolecta de acuerdo al censo realizado en cada una de las visitas a las localidades.....	70

## RESUMEN EN ESPAÑOL

La malaria es un problema importante de salud pública y es causada por parásitos *Plasmodium*, transmitidos a los humanos por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. En Colombia, las regiones El Bajo Cauca y Pacífico son actualmente las zonas más endémicas de malaria en el país. Para determinar la capacidad vectorial de las especies de *Anopheles* es necesario evaluar los parámetros entomológicos, como: abundancia, comportamiento de picadura, infectividad natural por *Plasmodium* spp. y el comportamiento y preferencia de alimentación; este último puede estar influenciado por factores intrínsecos o extrínsecos al vector. En este trabajo, se realizaron capturas de mosquitos empleando el método de malla polisombra y cebo humano protegido, entre las 18:00 y las 24:00 horas, en localidades endémicas de El Bajo Cauca y Pacífico, durante los años 2018-2021. Se realizaron censos de los animales presentes en los sitios de muestreo en un radio de 250 metros, durante los cuatro días de recolecta. Los mosquitos se identificaron mediante claves morfológicas y se confirmaron molecularmente por PCR-RFLP-ITS2. Las fuentes de alimentación con sangre de los mosquitos capturados reposando en las mallas fueron detectadas en ADN extraído del intestino de cada mosquito mediante PCR con cebadores dirigidos a los genes *MT-CYB* y *COI* para vertebrados. Se estimaron los índices de sangre humana e índices de forraje para determinar la preferencia de alimentación con sangre en las hembras alimentadas. Además, se determinaron índices entomológicos para los mosquitos capturados con método de cebo humano protegido: abundancia y composición de especies, actividad y hora de picadura, tasa de picadura al humano, tasa de infección y tasa de inoculación entomológica. En total, se recolectaron 1.927 especímenes *Anopheles*; en las localidades del Bajo Cauca, 188 en La Capilla, 311 en Villa Grande; en el Pacífico, 159 en la localidad San Antonio y 1.269 en Córdoba. *Anopheles (Nys.) darlingi* Root, 1926, fue la especie más abundante en Bajo Cauca y *Anopheles (Nys.) nuneztovari* Gabaldón, 1940, en el Pacífico colombiano. La tasa de picadura al

humano más alta se detectó para *An. nuneztovari* en Córdoba-Pacífico con 77,5 picaduras por persona por noche (p/p/n) y para *An. darlingi* en Villa Grande-Bajo Cauca con 17,5 p/p/n; ambos con actividad principalmente en el intradomicilio descubierto. Se detectó infección por *Plasmodium* en *An. nuneztovari* de la localidad de Córdoba-Pacífico, con una tasa de infección- de 0,49 %, correspondiente a una tasa de inoculación entomológica de 25 picaduras infectivas por año. El índice de sangre humana más alto se detectó en los vectores principales *An. nuneztovari* (57,1%) y *An. darlingi* (40%). Sin embargo, *An. nuneztovari* mostró preferencia para alimentarse de sangre de perros y *An. darlingi* de sangre de cerdos, perros y Galliformes, antes que el humano. Estos resultados sobre los indicadores entomológicos y el comportamiento de alimentación de las hembras de *Anopheles* permiten conocer cuáles son las especies que están participando en la transmisión de malaria y tener una mayor comprensión de cuál es la dinámica de la enfermedad en las localidades endémicas evaluadas. Además, este trabajo aporta a la vigilancia entomológica, brindando información valiosa que puede usarse para orientar intervenciones de control efectivas, dirigidas a minimizar el contacto humano-vector de acuerdo a la bionomía de las especies.

### **RESUMEN EN INGLES**

Malaria is an important problem of public health; it is caused by the bite of *Anopheles* female mosquitoes that are able to transmit the *Plasmodium* parasite to humans. In Colombia, the Bajo Cauca and Pacific regions are currently the most endemic malaria areas in the country. To determine the vectorial capacity of *Anopheles* species, it is necessary to evaluate entomological parameters, such as: abundance, biting behavior, natural infectivity by *Plasmodium* spp. and feeding behavior; the later can be influenced by vector intrinsic or extrinsic factors. In this work, mosquito collections were performed using barrier-screens and protected human bait, between 18:00 and 24:00 hours, in endemic localities

of Bajo Cauca and Pacific regions, during the years 2018-2021. A census of the animals present at the sampling sites was carried out within a radius of 250 meters, during the four collection days. Mosquitos were identified by morphological keys and were molecularly confirmed by PCR-RFLP-ITS2. Blood feeding sources were detected by PCR with primers targeting the *MT-CYB* and *COI* genes for vertebrates in DNA extracted from the intestine of mosquitoes collected resting on barrier-screens. Human blood index and forage index were estimated to determine blood feeding preference in fed females. In addition, entomological indices were determined for the mosquitoes captured under protected human bait method: species abundance and composition, human biting activity and time, human biting rate, infection rate and entomological inoculation rate. In total, 1,927 *Anopheles* specimens were collected; in localities of Bajo Cauca, 188 in La Capilla, 311 in Villa Grande; In Pacific, 159 in San Antonio and 1,269 in Córdoba. *Anopheles (Nys.) darlingi* Root, 1926, was the most abundant species in Bajo Cauca and *Anopheles (Nys.) nuneztovari* Gabaldón, 1940, in Pacific. The highest human bite rate was detected for *An. nuneztovari* in Córdoba-Pacific with 77.5 bites per person per night (p/p/n) and for *An. darlingi* in Villa Grande-Bajo Cauca with 17.5 p/p/n; both with activity mainly in the open intra-domicile. *Plasmodium* infection was detected in *An. nuneztovari* from Córdoba-Pacific, with an infection rate of 0.49%, corresponding to an entomological inoculation rate of 25 infective bites per year. The highest human blood index was detected for the main vectors *An. nuneztovari* (57.1%) and *An. darlingi* (40%). However, *An. nuneztovari* showed preference for feeding of dog blood and *An. darlingi* of pig, dog and Galliforms blood, rather than humans. These results on entomological indicators and the feeding behavior of *Anopheles* females allow to understand what species are participating in malaria transmission and have a better understanding on this disease dynamic in the evaluated endemic localities. In addition, this work contributes to the entomological surveillance, providing valuable information that can be used to orientate effective control interventions directed to minimize human-vector contact, in accordance with species bionomy.

## MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

### Malaria en Colombia

La malaria es considerada una de las enfermedades transmisibles más importantes en el mundo; es causada por parásitos del género *Plasmodium*, que son transmitidos a los humanos por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* (1). La enfermedad se presenta principalmente en países tropicales como Colombia, el cual ocupa el tercer lugar en las Américas en el número de casos de malaria (2). Para el año 2020, se reportaron 78.513 casos por las especies parasitarias *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890, *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 y *Plasmodium malariae* Grassi & Feletti, 1889, con las regiones El Bajo Cauca-BC y Pacífico colombiano-PAC como las más endémicas del país (3).

### Especies de *Anopheles* en Colombia

En Colombia se han identificado aproximadamente 47 especies de *Anopheles* (4–8); entre estas, *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus*, *Anopheles (Nys.) nuneztovari* y *Anopheles (Nys.) darlingi* son considerados vectores primarios de malaria por su abundancia, amplia distribución, longevidad, antropofilia y competencia vectorial (9). Se considera que siete especies tienen importancia local, *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald 1901, *Anopheles (An.) punctimacula* Dyar and Knab 1906 (10), *Anopheles (An.) calderoni* Wilkerson 1991(11–13), *Anopheles (Kerteszia) polidotus* Zavortink 1973(14,15), *Anopheles (Ker.) neivai* Howard, Dyar y Knab 1912 (4), *Anopheles (Nys.) rangeli* Gabaldon, Cova García & López 1940 y *Anopheles (Nys.) oswaldoi* Peryassú 1922 (16,17).

## **Abundancia y comportamiento de picadura de los vectores primarios**

La picadura por una especie de *Anopheles* es uno de los factores con mayor impacto en la capacidad vectorial, debido a que un vector para transmitir el parásito debe picar mínimo dos veces, inicialmente, para adquirirlo y posteriormente, para inocularlo (18). En ocasiones un vector debe picar múltiples veces para poder completar el ciclo gonotrófico; lo cual aumenta no solo la supervivencia y abundancia del vector, sino también, el riesgo de infección por *Plasmodium* en los humanos (18). Además, la abundancia y el comportamiento de picadura al interior o en el exterior de las casas pueden presentar variaciones que modulan su capacidad vectorial. Dichas variaciones pueden presentarse, entre otros, por presión de selección por insecticidas, que obligan a los vectores a buscar alimento en otros sitios (19) o cambios en el ambiente, como los causados por las actividades humanas como la deforestación, la agricultura y la minería (20,21). Por lo cual, los parámetros abundancia y comportamiento de picadura deben evaluarse frecuentemente en las localidades endémicas para malaria.

Con respecto a la bionomía de los principales vectores de malaria en Colombia, se ha reportado diferencias en el comportamiento de picadura y las abundancias entre regiones. *Anopheles albimanus* es un vector con amplia distribución en áreas costeras, encontrándose predominantemente en la Costa Atlántica y Pacífica del país; además, se presenta en las islas de San Andrés y Providencia (22–24). La presencia de estados inmaduros, se registra frecuentemente en pantanos costeros, estanques de peces y excavaciones, algunas veces en zonas urbanas y áreas alteradas por la actividad humana (23,25,26). La especie *An. albimanus*, posee un comportamiento oportunista siendo endofágico y exofágico, según la disponibilidad y número de hospederos que son fuente de alimentación (27). Se ha registrado a *An. albimanus* como una especie con comportamiento zoofílico (28); sin embargo, en el Pacífico colombiano se ha demostrado su actividad antropofílica (23) picando al interior de las casas hacia la media noche y en el peridomicilio entre las 18:00-21:00 horas (h) y 17:00-18:00 h (27,29,30). El rango de picadura al

humano se ha registrado entre 0,15-0,47 picaduras por persona por noche (p/p/n) para localidades de Córdoba y Antioquia, en el noreste de Colombia (31).

*Anopheles nuneztovari* es un vector importante de malaria en Colombia; se encuentra distribuido a ambos lados de la cordillera de los Andes y su comportamiento es principalmente antropofílico y endofágico, con una actividad de picadura en la noche, específicamente después de las 20:00 h (31,32). *Anopheles nuneztovari* se considera un complejo de especies que estaría compuesto por *Anopheles dunhami* Causey, *Anopheles goeldii* Rozeboom & Gabaldón, *An. nuneztovari* Gabaldón, *An. nuneztovari* linajes 1-5 (33–36), con diferencias en comportamiento a lo largo de su distribución en Sur América (36,37); particularmente en la Amazonia brasileña, se considera un vector local, con un comportamiento zoofílico (38,39). Para *An. nuneztovari* se ha reportado un rango de picadura al humano de 0,8-16,7 p/p/n para la región Urabá-Bajo Cauca-Alto Sinú (31,40) y 0,2-8,6 p/p/n para la región Pacífica de Colombia (12).

*Anopheles darlingi* es considerado el principal vector de América Latina y se encuentra ampliamente distribuido tanto en América Central como en América del Sur (39,41). En Colombia tiene una amplia distribución a ambos lados de la cordillera de los Andes (42). Específicamente en el Bajo Cauca, en trabajos que incluyen datos del uso de suelo, la presencia de este vector se ha relacionado con humedales, cuerpos de agua y cubiertas de pastos (21). Sus estadios inmaduros se han encontrado en pozos producto de la minería, la ganadería y los microcultivos de arroz (40). En el Departamento de Córdoba, esta especie presentó mayor abundancia durante los períodos de transición (al principio o al final de las lluvias), lo que puede estar influenciado por las actividades humanas que proporcionan hábitats larvales temporales que favorecen el desarrollo de estados inmaduros del mosquito (40). En el Pacífico colombiano, se ha reportado a *An. darlingi* como una especie antropofílica y endo-exofágica (31). En el Departamento de Putumayo en la región de la Amazonía, ha presentado una actividad de picadura principalmente desde

las 19:00 h; sin embargo, en el departamento de Antioquia en la región del Bajo Cauca se ha observado picos de picadura entre 19:00 h y 23:00 h (42). El rango de picadura al humano ha sido estimado en 0,03-14,5 p/p/n para la región Urabá-Bajo Cauca-Alto Sinú (40) y 9,0-89,9 p/p/n para la región Pacífica de Colombia (12).

### **Infección natural de especies de *Anopheles* por *Plasmodium* spp.**

La determinación de la infección natural por *Plasmodium* spp. y conocer cuál es la etapa de desarrollo del parásito en el vector, es de utilidad para la estimación de la competencia vectorial (18,43), ya que permite determinar si un mosquito solo está infectado o es infectivo, y con ello, incriminar las especies de *Anopheles* que realmente participan en la transmisión de la malaria (23,40). En Colombia, los vectores principales *An. albimanus*, *An. nuneztovari* y *An. darlingi*, se han encontrado infectados naturalmente con especies de *Plasmodium* (12,31,44). Particularmente, en el Pacífico colombiano *An. albimanus* se detectó infectado con *P. vivax* en los municipios Nuquí y Buenaventura y con *P. falciparum* en Buenaventura (23). En esta misma región, *An. nuneztovari* se detectó infectado con *Plasmodium* sp. (45) y *P. vivax* en Buenaventura (32). En el noroccidente de Colombia, *An. nuneztovari* se encontró infectado con *P. vivax* en las localidades de Montelíbano, Tierralta (31), Puerto Libertador - Córdoba y El Bagre - Antioquia (32,40). *Anopheles darlingi* se ha encontrado infectado en dos localidades del departamento de Antioquia, en El Bagre con *P. vivax* (40) y en Vigía del Fuerte con *P. falciparum* (12). Además, en el país, se han encontrado otras especies anofelinas infectadas; algunas de ellas se han implicado como vectores a nivel local, como *An. neivai*, especie que se ha reportado infectada con *P. falciparum* y *P. vivax* en localidades endémicas para malaria del Chocó (23); *An. calderoni*, recientemente encontrado infectado con *P. falciparum* y *P. vivax* en Nariño (11,12), y *An. punctimacula* que se ha asociado epidemiológicamente relacionado con brotes de malaria y detectado infectado naturalmente con

*Plasmodium* spp. (46). Adicionalmente, *An. triannulatus* se detectó infectado con *P. vivax* en El Bagre, Antioquia (44,47); sin embargo, aún no se conoce el papel que juega esta especie en la transmisión del parásito.

### **Métodos de detección de *Plasmodium* en especies de *Anopheles***

Para la detección de *Plasmodium* spp. en los vectores la prueba que se ha usado como el *gold* estándar, es la visualización de esporozoítos en glándulas salivales por microscopía; sin embargo, es una prueba laboriosa que requiere de personal calificado y no es practica en el caso del análisis de un número grande de especímenes (48). También, se han usado frecuentemente metodologías como el Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA), que utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos a *P. falciparum*, *P. vivax* VK247/VK210 y *P. malariae* (23,47,49,50). En la actualidad, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la metodología usada con más frecuencia para la detección de *Plasmodium*. Una de las estrategias es la PCR anidada que usa cebadores específicos del género *Plasmodium* que amplifican una región de la subunidad ribosomal pequeña o 18S rRNA del parásito (51). Existen otros tipos de PCR convencional dirigidas a la amplificación de regiones de genes blanco del parásito como, el gen citocromo oxidasa subunidad I-COI (52) y Citocromo b-CYB (53). Adicionalmente, se ha utilizado la PCR en tiempo real, basada en la cuantificación de ADN amplificado y detectado por emisión de fluorescencia directamente proporcional a la amplificación (54). Y como tecnología más novedosa, se encuentra el MALDITOF (55), la cual utiliza las huellas digitales espectrales que varían entre los microorganismos; sin embargo, su costo es mas elevado comparado con tecnicas de PCR e Inmunoensayos.

### **Alimentación con sangre de las hembras de *Anopheles***

Las hembras de los mosquitos *Anopheles* pican a un hospedero para alimentarse de sangre y obtener los nutrientes necesarios para la ovoposición (56); por tanto, la identificación de los hospederos que son las fuentes de sangre, constituye un estimativo del hábito de picadura de las especies vectoras (43,57,58). Se ha reportado que los vectores principales se alimentan frecuentemente de los humanos, comportamiento vectorial conocido como antropofilia, el cual es clave para incriminar una especie como vector (31); sin embargo, también se ha reportado que pueden alimentarse de otros hospederos vertebrados (59–61). Las especies de *Anopheles* en su búsqueda por nutrientes sanguíneos pueden alimentarse hasta dos veces de un hospedero para completar el ciclo gonotrófico, como se ha evidenciado en *An. darlingi* (62). Lo anterior, podría aumentar no solo la frecuencia de picadura al humano sino el riesgo de infección por *Plasmodium*. Ello sugiere la importancia de plantear una alternativa de control para la malaria que disminuya el contacto humano-vector y, por ende, el riesgo de ser infectado por *Plasmodium* durante la picadura del mosquito (59,63).

### **Métodos para la identificación de hospederos como fuente sangre para las especies de *Anopheles***

Para determinar cuáles son los hospederos que constituyen la fuente de sangre para los vectores de importancia médica, se realizan estudios en campo en que se capturan mosquitos *Anopheles* en reposo (64); para ello, se han utilizado mallas polisombra, capturas en la vegetación y trampas CDC (19,65). Estos métodos permiten disminuir el sesgo en la determinación de la fuente de sangre por atracción de un *Anopheles* hacia un hospedero específico (61,66,67). Además, el uso de técnicas como PCR, el ensayo de ELISA (68–70) y MALDI-TOF (71) ha permitido detectar el ADN de distintos hospederos en la sangre extraída del intestino del vector (72). Los sitios blancos utilizados han sido regiones de los genes mitocondriales, citocromo oxidasa I-*COI* (73,74), *16S* rRNA (75) y citocromo b mitocondrial *MT-CYB*

(72,76). Específicamente, el gen MT-CYB tiene utilidad para la identificación de ADN de hospederos fuente de sangre para *Anopheles*, debido al elevado número de copias por célula (77,78) y por la variación genética a nivel de secuencia primaria entre taxones de vertebrados que es suficiente para la identificación confiable de la fuente de alimentación (72).

### **Hospederos que constituyen la fuente de sangre para los mosquitos *Anopheles***

Entre los hospederos que constituyen las fuentes de sangre para la alimentación de las hembras, el más frecuentemente reportado es el humano; sin embargo, también se han registrado otros vertebrados y aves como fuentes de alimentación (67,79,80). Este comportamiento de alimentación oportunista amplía el rango de fuentes de sangre para los mosquitos, aumentando su supervivencia y abundancia, lo que podría contribuir a mantener la población de *Anopheles* y, por ende, la transmisión de malaria en una localidad (81). Se ha reportado especies de *Anopheles* que pueden presentar un hábito de picadura oportunista, detectándose alimentadas en mayor proporción de sangre de un hospedero diferente al humano; por ejemplo, *An. albimanus* de Honduras alimentado principalmente de gallinas y ganado (81), y *An. darlingi* de Perú (61) alimentado en mayor proporción de sangre de gallinas. Adicionalmente, se ha documentado un comportamiento oportunista en especies como *An. neivai* y *An. punctimacula* alimentadas principalmente de la sangre de vacas (81,82), en *An. aquasalis*, de bovinos, caballos, cerdos y perros (80) y en *An. pseudopunctipennis*, de ovejas, cabras y burros principalmente (83).

### **Estrategias de control vectorial**

Las estrategias para la prevención y control de la malaria han tenido dos enfoques: la inhibición del desarrollo del parásito por medio de compuestos antiparasitarios y el control de los vectores (1,2). El control de vectores es la principal estrategia recomendada por la OMS para controlar la malaria (1) y se

basa principalmente en la utilización de Toldillos Impregnados con Insecticidas de Larga Duración (TILD) y la Fumigación de Interiores con Insecticidas de Efecto Residual (FIIER) (84). Sin embargo, dada la resistencia de los parásitos a los medicamentos y de los mosquitos a los insecticidas (11,85), ha surgido la necesidad de explorar alternativas destinadas a optimizar el control vectorial. Entre ellas, se encuentra la técnica de insectos estériles (SIT, por sus siglas en inglés Sterile Insect Technique) (86), el uso de agentes de control biológico de estados inmaduros (87–90), la paratransgénesis, la cual usa microorganismos aislados del vector que son genéticamente modificados y reintroducidos en el intestino del mosquito para ejercer un efecto antiparasitario (91), y la zooprofilaxis (92); esta última consiste en tener en el entorno de las viviendas animales que sirvan como barrera y minimicen el contacto humano-vector (59,63). Todas estas estrategias de control vectorial se proponen con base en estudios de los vectores en campo y el análisis de los componentes de la capacidad vectorial.

### **Componentes de la capacidad vectorial**

La capacidad vectorial se define como el número esperado de nuevas inoculaciones a partir de un caso infectivo y, se ha expresado en un modelo matemático que incluye los factores biológicos: densidad vectorial, hábito de picadura, competencia y supervivencia del vector, como determinantes de riesgo de transmisión del parásito a los humanos por un vector (18,43,93). Por tanto, para estimar la capacidad de un mosquito de transmitir patógenos, es necesario analizar cada componente; se parte de la premisa que la correcta identificación de las especies de *Anopheles* es la base para cualquier estudio entomológico que incluya incriminación vectorial y bionomía de especies (16,94,95).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La malaria continúa siendo un problema de salud pública en América; las cifras posicionan a Colombia en el tercer lugar en número de casos de malaria, con las regiones Bajo Cauca y Pacífico colombiano como las más endémicas del país (3). El control de vectores es la estrategia recomendada por la OMS para eliminar la malaria (1) y se basa principalmente en la utilización de Toldillos Impregnados con Insecticidas de Larga Duración (TILD) y la Fumigación de Interiores con Insecticidas de Efecto Residual (FIIER) (84). Sin embargo, dada la resistencia a los insecticidas de uso común (11,85) y el número alto de muertes por malaria (1), se ha sugerido el uso de estrategias de control vectorial alternativas basadas en el estudio de los vectores en campo y el análisis de los componentes de la capacidad vectorial; tales como la técnica de insectos estériles (SIT, por sus siglas en inglés Sterile Insect Technique) (86), el uso de agentes de control biológico de estados inmaduros (87–90), la paratransgénesis (91) y la zooprofilaxis (92).

Los componentes de la capacidad vectorial, como la densidad vectorial, hábito de picadura y competencia vectorial, permiten estimar la capacidad de un mosquito de transmitir patógenos y conocer el riesgo de transmisión del *Plasmodium* a los humanos (18,43,93). Estos componentes pueden ser evaluados por medio de indicadores entomológicos como abundancia de vectores, hora y actividad de picadura, tasa de picadura al humano, índice de sangre humana, tasa de infección y tasa de inoculación entomológica. Índices que pueden presentar variaciones entre especies y localidades, debido, entre otros aspectos, a los cambios de comportamiento de los mosquitos, los cuales pueden estar influenciados por modificaciones en el ambiente, generalmente originadas por las actividades humanas (20,21), disponibilidad de hospederos para alimentarse (96) o presión de selección de insecticidas (76,97). Por tanto, los parámetros entomológicos de las especies que participan en la transmisión de malaria en las áreas endémicas deben evaluarse frecuentemente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que antes de realizar estudios

entomológicos, que impliquen por ejemplo el comportamiento de los vectores, es necesario la correcta identificación de las especies de *Anopheles*.

La identificación de los hospederos de las hembras de *Anopheles* que son la fuente de sangre para la obtención de nutrientes necesarios para la ovoposición, constituye un estimativo del hábito de alimentación y picadura (43,56,57). Aunque se considera que las diferentes especies de *Anopheles* tienen preferencias específicas por sus hospederos (76), la elección de sus fuentes de sangre puede variar según la disponibilidad y abundancia de esos hospederos (61,71). Entre los hospederos para los vectores principales, el más frecuentemente reportado, es el humano (67,79); sin embargo, también se ha registrado que pueden alimentarse de otros hospederos vertebrados (56,76,83). En vectores de Latinoamérica, especies como *An. albimanus* en Honduras (81) y *An. darlingi* en Perú (61), se han encontrado alimentadas en mayor proporción de gallinas que de humanos; se sugiere que esto contribuye a mantener la población de mosquitos y pudiera explicar la continuidad de la transmisión de *Plasmodium* en las localidades. Otro aspecto importante a evaluar es el comportamiento de alimentación en los mosquitos; su estimación permite plantear alternativas de control para la malaria en las que se disminuya el riesgo para los humanos de ser infectados por *Plasmodium* durante la picadura del mosquito; por ejemplo, con el uso de animales alrededor de la vivienda que sirvan como barrera entre el humano y el vector o zooprofilaxis (59,63).

La determinación de la infección natural por *Plasmodium* spp. es un parámetro entomológico importante para la estimación de la competencia vectorial (18); su estimación permite incriminar a las especies de *Anopheles* que realmente participan en la transmisión de la malaria (23,31,40,60). Los tres vectores principales, *An. albimanus*, *An. darlingi* y *An. nuneztovari*, han sido encontrados infectados naturalmente con especies de *Plasmodium* en las regiones Bajo Cauca, Pacífico colombiano y Noreste de Colombia

(23,40,44); sin embargo, se han encontrado otras especies de *Anopheles* para las cuales debe esclarecerse el rol que cumplen en la transmisión, como es el caso de *An. triannulatus* infectado con *Plasmodium* spp. (44,47) y *An. punctimacula*, asociado epidemiológicamente con brotes de malaria en Armenia, Colombia (46).

Considerando que el estudio de los componentes de la capacidad vectorial nos permite comprender, de una forma más clara, la dinámica de la transmisión de malaria en las localidades y que para los vectores de malaria de Colombia no existen registros de los hospederos que constituyen las fuentes de sangre para la alimentación de las hembras de *Anopheles*, el objetivo de este trabajo fue estudiar componentes claves de la capacidad vectorial y las fuentes de sangre para las hembras de *Anopheles*. Para ello se determinaron varios índices entomológicos como la abundancia y composición de especies, actividad y comportamiento de picadura, identificación de hospederos y la determinación de infección natural de los especímenes recolectados en localidades endémicas del Bajo Cauca y Pacífico colombiano. Lo anterior, con el fin de ampliar el conocimiento sobre aspectos de la bionomía de los vectores de malaria y su compartimiento, lo cual es de utilidad para el diseño y orientación de las estrategias de control destinadas a la protección de las personas que habitan en las zonas endémicas.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los hospederos que constituyen la fuente de sangre para la alimentación de las hembras de *Anopheles* y los indicadores entomológicos relacionados con la transmisión de *Plasmodium* en zonas endémicas del Bajo Cauca y Pacífico colombiano?

## **HIPÓTESIS**

Las especies de *Anopheles* son oportunistas en la alimentación con sangre de sus hospederos y los indicadores entomológicos de las especies detectadas en zonas endémicas presentan variaciones a nivel geográfico, entre localidades.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar los hospederos que constituyen la fuente de sangre para la alimentación de las hembras de *Anopheles* e indicadores entomológicos relacionados con la transmisión de *Plasmodium* en zonas endémicas del Bajo Cauca y Pacífico colombiano.

### **Objetivos Específicos**

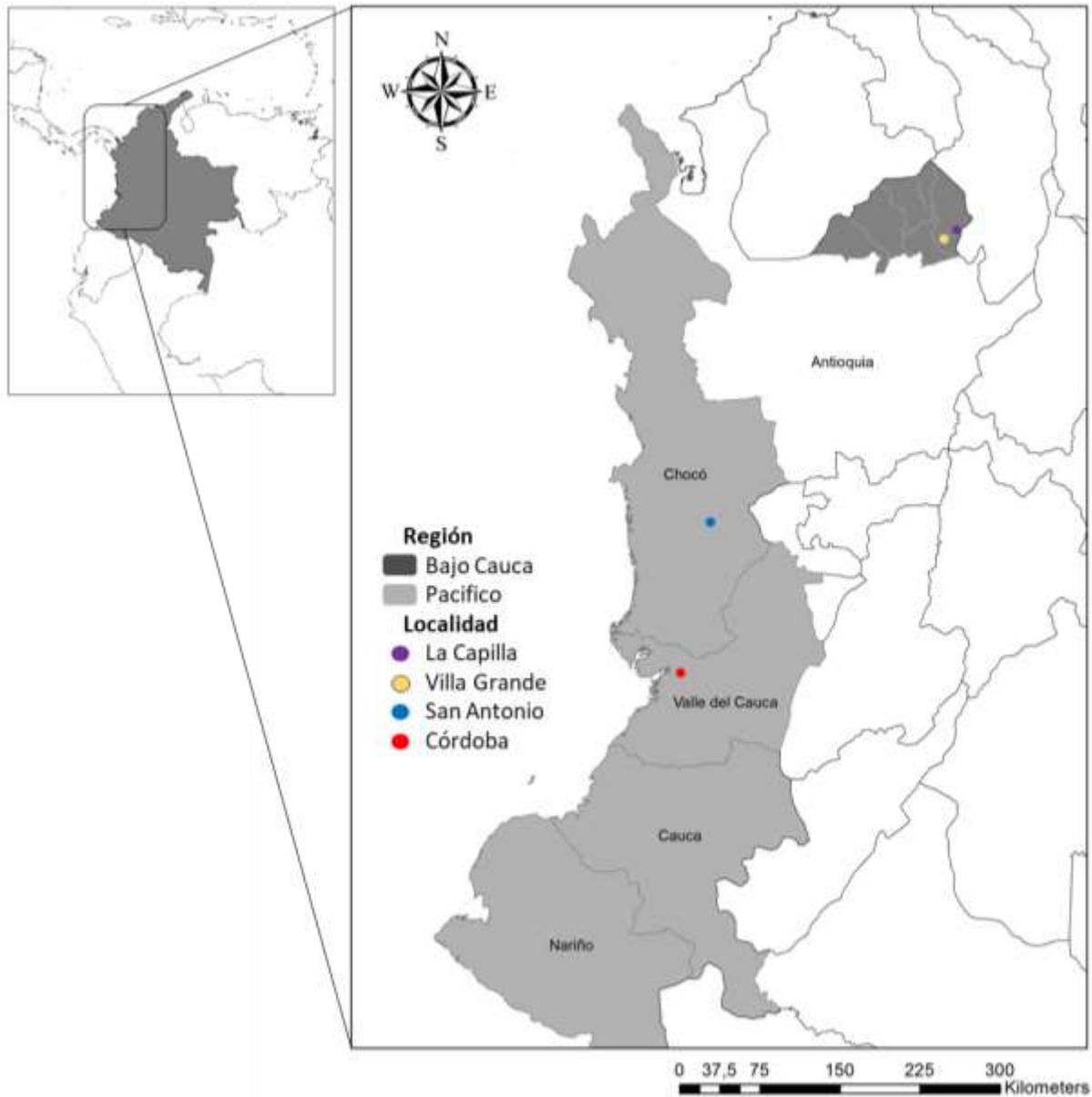
1. Identificar los hospederos que constituyen la fuente de sangre para la alimentación de las hembras de *Anopheles* recolectadas en zonas endémicas del Bajo Cauca y Pacífico colombiano.
2. Estimar indicadores entomológicos relacionados con la transmisión de *Plasmodium* en zonas endémicas del Bajo Cauca y Pacífico colombiano.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Área de estudio y recolecta de especímenes**

Los mosquitos del género *Anopheles* fueron recolectados en cuatro localidades: La Capilla y Villagrande ubicadas en el municipio del Bagre, departamento de Antioquia; San Antonio, ubicada en el municipio de Istmina, departamento de Chocó y Córdoba, ubicada en el municipio de Buenaventura, departamento

del Valle del Cauca (**Figura 1**). El muestreo se realizó entre los años 2018 y 2021, con dos salidas de campo a cada localidad, durante cuatro noches consecutivas, entre las 18:00-24:00 h. Los mosquitos adultos fueron recolectados en reposo sobre mallas polisombra negra 70% de oscuridad, de 2 x 10 metros, ubicadas alrededor de la casa formando barreras físicas en puntos estratégicos (casa-bosque, casa-río, casa-carretera) para recolectar hembras de *Anopheles* que ingresan a picar dentro de las casas o salen a reposar en exteriores luego de picar (64). Se colectó simultáneamente en otra casa, a 1 km<sup>2</sup> de distancia, en el intradomicilio y peridomicilio usando el método de atrayente con cebo humano protegido. Se tomó como intradomicilio los espacios de cocina, sala y habitaciones de la casa que estaban descubiertos, debido a la arquitectura de las viviendas. El peridomicilio fue definido como aquellas áreas a una distancia de hasta 10 metros alrededor de las casas. Las recolectas con el método de cebo humano fueron realizadas con previo consentimiento informado y protocolo aprobado por el comité de Bioética de la Universidad de Antioquia (CBEIH-SIU, Acta 18-41-823 y 18-35-810).



**Figura 1. Mapa de sitios de muestreo de especímenes *Anopheles* en Colombia.** En colores se representa la ubicación de cada una de las localidades muestreadas en las regiones endémicas Bajo Cauca y Pacífico colombiano. Software Arcgis 10.8.

### **Censo de humanos y animales presentes en los sitios de muestreo**

Se realizó un censo diario de los humanos y animales domésticos y/o de corral, que estuvieran presentes en el sitio de recolecta hasta 250 metros de radio de la casa, teniendo como criterio el rango de vuelo de los mosquitos *Anopheles* y la geografía del sitio. El formato de registro del censo incluyó: tipo de animal,

número, presencia durante el día y/o noche, permanencia en el interior o exterior de las viviendas, y la administración o no de antiparasitarios (**Anexo 1**).

### **Procesamiento de especímenes en campo**

El intestino de las hembras de *Anopheles*, recolectadas con malla polisombra, fue disectado en campo bajo un estero-microscopio (AmScope SE 100-ZZ), y se registró la presencia/ausencia de sangre en el intestino. Las disecciones fueron procesadas en portaobjetos de vidrio estériles, utilizando materiales esterilizados con etanol entre cada muestra. Los intestinos se conservaron individualmente en papel Whatman FTA<sup>®</sup> hasta ser procesados en el laboratorio para detectar la fuente de sangre de hospederos vertebrados mamíferos y Galliformes. El resto del material biológico (patas, alas, tórax y cabeza) fue almacenado en sílica gel, al igual que los mosquitos recolectados con cebo humano, para la identificación de la especie.

### **Identificación de especies de *Anopheles***

Los especímenes recolectados con el método de cebo humano fueron identificados utilizando claves taxonómicas (5); se realizó un respaldo morfológico con especímenes representativos y el montaje de alas y pata en portaobjeto de vidrio de un porcentaje de los mosquitos. Además, se realizó la confirmación molecular mediante PCR-RFLP-ITS2 (95,98) de un *n* representativo de mosquitos de cada especie. Todos los mosquitos recolectados con malla polisombra, disectados en campo, fueron identificados por métodos moleculares.

### **Extracción de ADN del intestino y el tórax de los especímenes**

Se extrajo el ADN a partir de la muestra de sangre presente en el intestino, conservada en papel Whatmann<sup>®</sup>, para identificar los hospederos que fueron la fuente de alimentación de las hembras de *Anopheles* recolectadas. Se utilizaron dos discos de 2mm de diámetro cada uno, cortados del papel que contenía cada muestra de sangre, usando un perforador Harris Uni-Core<sup>®</sup>. Además, a partir del ADN genómico obtenido del tórax de los especímenes se realizó la confirmación molecular de especie y la detección de infección natural por *Plasmodium* spp. La extracción de ADN de intestino y tórax se realizó bajo un protocolo de precipitación salina (99). Para ello, a cada muestra se le agregó tampón de lisis, se maceró e incubó a 56°C por 30 min para generar la ruptura de la pared celular; luego, se adicionó 14,5µL de acetato de potasio e incubó 1 hora en hielo. Luego, se realizaron tres pasos de precipitación con etanol y subsiguiente centrifugación a 13.000 rpm, en refrigeración. Finalmente, cada muestra se resuspendió en 25µL de tampón TE (Tris-Ácido etilendiaminotetraacético), se incubó a 65°C por 10 min y almacenó a -20°C hasta su procesamiento por técnicas de PCR.

### **Detección de los hospederos vertebrados mamíferos que son fuentes de alimentación para las especies de *Anopheles* basada en la amplificación del gen *CYB*.**

Para conocer la identidad de los hospederos vertebrados mamíferos, de los cuales las hembras de *Anopheles* se alimentaron, se realizó una PCR multiplex con el fin de amplificar una región del gen mitocondrial *CYB*, usando el oligonucleótido universal reverso UNREV1025 y los oligonucleótidos específicos para humanos, cerdos, perros, vacas y cabras (72). Las condiciones de la amplificación fueron: un ciclo de 95 °C durante 5 min, 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 7 min. La presencia del amplicón se confirmó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2% usando como guía el marcador de peso molecular de 100 pb,

teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador UV (Cleaver Scientific). Los productos se identificaron por diferencias de tamaño del amplicón: 334 pares de bases (pb) para humanos, 453 pb para cerdos, 680 pb para perros, 561 pb para vacas y 132 pb para cabras. Los controles positivos de la PCR fueron muestras de ADN, extraído a partir de sangre de humano, cerdo, vaca y perro; el ADN extraído del intestino de machos de *Anopheles* fue usado como control negativo.

### **Detección de los hospederos aves que son fuentes de alimentación para las especies de *Anopheles* basada en la amplificación del gen *CYB***

Se amplificó por PCR un fragmento del gen mitocondrial *CYB* para aves, usando los oligonucleótidos específicos del orden Galliformes, Passeriformes y Columbiformes (100). La PCR-*CYB* aviar se procesó bajo las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de 95 °C durante 5 min, 49 ciclos a 94 °C por 30 seg, 65 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 4 min. Los productos de PCR fueron: 210 pb para Galliformes, 165 pb para Passeriformes y 333 pb para Columbiformes. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con marcador de peso molecular 100 pb, teñido con bromuro de etidio utilizando un transiluminador UV. Los controles positivos de la PCR fueron muestras de ADN extraído a partir de sangre de Galliformes, Passeriformes y Columbiformes; el ADN extraído del intestino de machos de *Anopheles* fue usado como control negativo.

### **Detección de los hospederos vertebrados mamíferos que son fuentes de alimentación para las especies de *Anopheles* basada en la amplificación del gen *COI***

Adicionalmente, se amplificó por PCR una región del gen mitocondrial *COI* (101) para aumentar la probabilidad de detección de ADN de hospederos en las muestras analizadas y brindar un mayor soporte a los resultados obtenidos. Se usaron los oligonucleótidos universales Mod\_Rep*COI*\_F y

Mod\_RepCOI\_R que amplifican una región de 664 pb aproximadamente. Las condiciones de la amplificación fueron: un ciclo de 95 °C durante 4 min, 40 ciclos a 95 °C por 40 seg, 48,5 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 7 min. La presencia del amplicón se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% con marcador de peso molecular 1 Kb, teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador UV. Dado que las muestras se procesaron paralelamente por MT-CYB y en ambas se obtuvo un porcentaje similar de muestras positivas, para tener una confirmación adicional, el 30% de los productos de amplificación fueron secuenciados por Sanger con el primer universal para vertebrados Mod\_RepCOI F. Los controles positivos de la PCR fueron muestras de ADN extraído a partir de sangre de humano, cerdo, vaca y perro; el ADN extraído del intestino de machos de *Anopheles* fue usado como control negativo.

### **Análisis de las secuencias del gen COI usadas para la identificación de los hospederos que son fuentes de alimentación para las especies de *Anopheles***

Las secuencias del gen COI fueron editadas en el programa Geneious versión 8.0.2 (102). Se identificó el hospedero realizando un análisis MegaBlast de cada secuencia, la cual fue comparada con secuencias de vertebrados reportadas en las bases de datos NCBI. Para definir la identidad genética de cada secuencia a nivel de género y/o especie, se consideraron los criterios de Grado, valor E, identidad genética, sitios idénticos y cobertura de la consulta.

### **Detección de infección natural por parásitos *Plasmodium* en *Anopheles***

Se llevó a cabo un ensayo de PCR anidada con los cebadores específicos del género que amplifican un fragmento de la subunidad pequeña del ribosoma -18S rRNA de *Plasmodium* (51). Los cebadores usados en la primera ronda de PCR, rPLU1 y rPLU5, amplifican una región de 1640 pb, mientras que los

cebadores de la segunda ronda de PCR, rPLU3 y rPLU4, amplifican un fragmento de 240 pb, aproximadamente. Para la PCR anidada se usaron mezclas de hasta cinco tórax de mosquitos *Anopheles* de la misma especie. Los grupos positivos y las muestras individuales fueron confirmadas mediante una nueva PCR anidada con cebadores específicos de especie, *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*. Adicionalmente, se realizó una PCR usando los cebadores *COXIII\_F* y *COXIII\_R* que amplifican una región, de aproximadamente 500 pb, del gen citocromo oxidasa III - *COXII* de *Plasmodium*. La PCR fue optimizada en el laboratorio con el fin de aumentar la probabilidad de detección de mosquitos infectados (52,103).

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para amplificar la región del gen MT-*CYB* y *COI* para vertebrados, y *18s rRNA* y *COXIII* para *Plasmodium*.

GEN AMPLIFICADO	CEBADOR	SECUENCIA 5'- 3'	TAMAÑO (pb)
<i>CYB</i> vertebrados mamíferos	Pig573_F	CCTCGCAGCCGTACATCTC	453
	Human741_F	GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT	334
	Goat894_F	CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCTC	132
	Dog368_F	GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT	680
	Cow121_F	CATCGGCACAAATTTAGTCG	561
	UNREV1025	GGTTGTCTCCAATTCATGTTA	–
<i>CYB</i> aves	Galliforme_F	ATTTCCGGCTCCCTATTAGCAG	210
	Galliforme_R	GTCCGATGTGAAGGAAGATACAGATGAAGAAGAA	
	Passeriforme_F	RGCMCTRGCHGCCTCMRTCCTAG	165
	Passeriforme_R	AAYGGGTGTTCKACTGGTTGGCT	
	Columbiforme_F	CTMACMGGMYTACTACTMGCCG	333
	Columbiforme_R	GGTTTGGCCAATGTAGGGGAC	
<i>COI</i> vertebrados mamíferos	Mod_Rep <i>COI</i> _F	TNTTYTCMACYAACCACAAAGA	664
	Mod_Rep <i>COI</i> _R	TTCDGGRTGNCCRAARAATCA	
<i>18s Plasmodium</i>	rPIU_1	TCAAAGAATAAGCCATGCAAGTGA	1640
	rPIU_5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC	
	rPIU_3	TTTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT	240
	rPIU_4	TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC	
<i>COXIII Plasmodium</i>	<i>COXIII_F</i>	AGCGGTAAACCTTTCTTTTTCCTTACG	500
	<i>COXIII_R</i>	AGTGCATCATGTATGACAGCATGTT TACA	

## **Estimación de índices entomológicos**

El pico máximo de picadura fue definido como la hora de máxima actividad de picadura para cada especie de *Anopheles* en cada localidad, mostrando su actividad en el intra y peridomicilio. La Tasa de infección (TI) se calculó como el porcentaje de mosquitos positivos para *Plasmodium* con respecto al número total de mosquitos analizados por especie, localidad y región. La tasa de picadura al humano (TPH) se calculó como el número total de especies de *Anopheles* capturados por el método de cebo humano, dividido por el número total de días de recolecta y el número de colectores. La tasa de inoculación entomológica (TIE) se obtuvo multiplicando la TPH por la TI por sitio por año (40,104). Además, se determinó el índice de sangre humana (ISH) para cada especie, calculando la proporción de mosquitos alimentados con sangre humana en relación con el número de mosquitos analizados. Finalmente, se calculó el índice de forraje (IF), el cual se usa para determinar la preferencia de alimentación de un vector por un hospedero; para esto, se construyó una matriz con las proporciones de los hospederos detectados por métodos moleculares para cada una de las especies de *Anopheles* y la proporción de animales censados en el sitio de estudio. Un IF >1 indica preferencia, <1 indica divergencia o selección de otro hospedero y ~1 no indica ni preferencia ni divergencia (61,105).

## **RESULTADOS**

### **Abundancia y composición de las especies de *Anopheles* recolectadas en campo**

Se recolectaron en total 1.927 especímenes de *Anopheles* en cuatro localidades de las regiones Bajo Cauca y Pacífico colombiano; 188 especímenes de La Capilla-BC y 311 de Villa Grande-BC, 159 especímenes de San Antonio-PAC y 1.269 de Córdoba-PAC. Del total de especímenes, 433 fueron recolectados en malla polisombra y 1.494 por el método de cebo humano. En BC, se recolectaron 4 especies de *Anopheles*. En La Capilla-PAC, la especie más abundante fue *An. darlingi* (61,2%), seguida

por *An. nuneztovari* s.s (22,3%), *An. triannulatus* (11,2%) y *An. braziliensis* (5,3%). En Villa Grande las especies más abundantes fueron, *An. darlingi* (56,6%) y *An. nuneztovari* s.s (41,5%) y la especie menos abundante fue *An. triannulatus* (0,6%). En San Antonio-PAC, se recolectaron los vectores principales de Colombia, *An. nuneztovari* s.s y *An. darlingi*, cuyas abundancias corresponden al 67,9% y 32,1%, respectivamente. En Córdoba-PAC, la única especie encontrada fue *An. nuneztovari* s.s (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Abundancia, composición y parámetros entomológicos de las especies *Anopheles* recolectadas en cuatro localidades endémicas para malaria en Colombia, por método de malla polisombra y cebo humano.

Región/ Municipio/ Localidad/ Coordenada	Año y Mes de recolecta	Especie	Especímenes recolectados en malla n (%)	Especímenes recolectados con CH n (%)	TPH	TI (%)	TIE
<b>Bajo Cauca/</b> El Bagre La Capilla/ N 5° 7' 49"O 77° 18' 35"	2018 Octubre	<i>An. darlingi</i>	26 (6)	18 (1,2)	2,25	-	-
		<i>An. nuneztovari</i> s.s	8 (1,8)	2 (0,1)	0,25	-	-
		<i>An. triannulatus</i>	19 (4,4)	-	-	-	-
	2020 Marzo	<i>An. darlingi</i>	3 (0,7)	68 (4,6)	8,5	-	-
		<i>An. nuneztovari</i> s.s	3 (0,7)	29 (1,9)	3,625	-	-
		<i>An. triannulatus</i>	1 (0,2)	1 (0,1)	0,125	-	-
		<i>An. braziliensis</i>	1 (0,2)	9 (0,6)	1,125	-	-
<b>Bajo Cauca/</b> El Bagre Villa Grande/ N 7° 32' 0"O 74° 42' 16"	2019 Agosto	<i>An. darlingi</i>	19 (4,4)	140 (9,4)	17,5	-	-
		<i>An. nuneztovari</i> s.s	28 (6,5)	82 (5,5)	10,25	-	-
		<i>An. braziliensis</i>	1 (0,2)	3 (0,2)	0,375	-	-
	2020 Noviembre	<i>An. darlingi</i>	-	17 (1,1)	2,125	-	-
		<i>An. nuneztovari</i> s.s	3 (0,7)	16 (1,1)	2	-	-
		<i>An. triannulatus</i>	1 (0,2)	1 (0,1)	0,125	-	-
<b>Pacífico/</b> Istmina San Antonio/ N 7° 31' 25"O 75° 16' 32"	2018 Octubre	<i>An. nuneztovari</i> s.s	55 (12,7)	-	-	-	-
		<i>An. darlingi</i>	11 (2,5)	-	-	-	-
	2021 Febrero	<i>An. nuneztovari</i> s.s	5 (1,2)	48 (3,2)	6	-	-
		<i>An. darlingi</i>	3 (0,7)	37 (2,5)	4,625	-	-
<b>Pacífico/</b> Buenaventura Córdoba/ N 3° 52' 19"O 77° 4' 11"	2019 Mayo	<i>An. nuneztovari</i> s.s	126 (29,1)	620 (41,5)	77,5	-	-
	2019 Noviembre	<i>An. nuneztovari</i> s.s	120 (27,7)	403 (27)	50,375	0,496* <i>P. vivax</i>	25

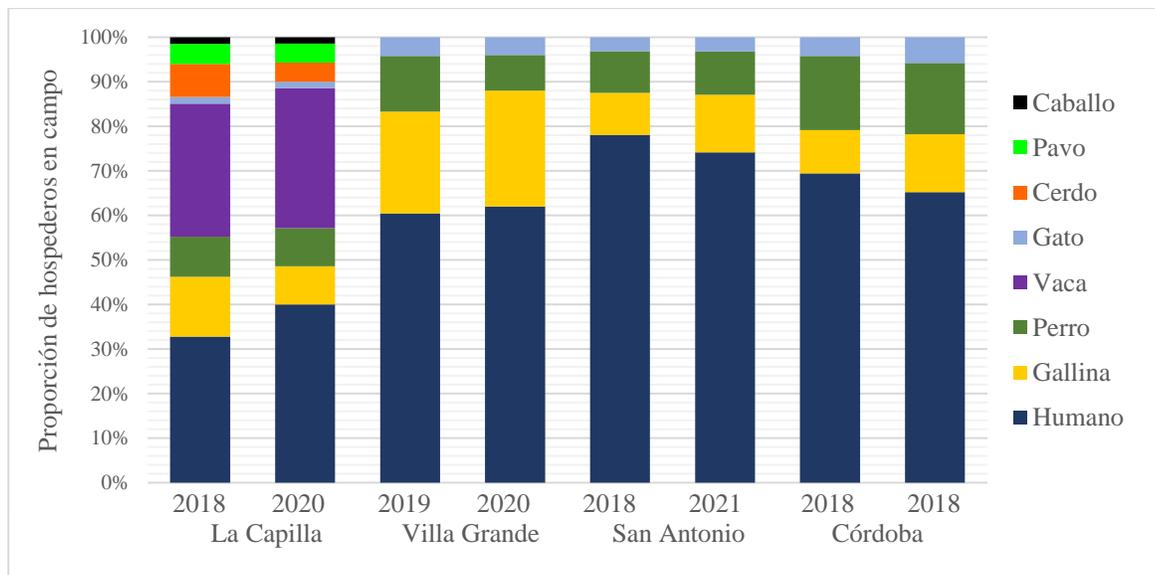
\* Infección natural detectada por PCR anidada y positiva para *P. vivax*.

CH: Cebo humano. TPH: Tasa de picadura al humano. TI: Tasa de infección. TIE: Tasa de inoculación entomológica.

Los parámetros entomológicos TPH y TIE fueron calculados únicamente para los mosquitos recolectados con CH.

## Registro de humanos y animales presentes en las cuatro localidades de estudio

Al realizar el censo, el cual incluyó a mamíferos y aves presentes a una distancia hasta de 250 metros de radio de la casa, se registraron 439 posibles hospederos vertebrados en los cuatro sitios de muestreo, de los cuales el humano fue el más abundante. En el censo no se registró el número de aves con vuelo, dado el sesgo por inexactitud en el conteo que pudiera generarse. En las cuatro localidades, La Capilla-BC, Villa Grande-BC, San Antonio-PAC y Córdoba-PAC, se encontró presencia de humanos, gallinas, perros y gatos durante el día y la noche, principalmente en zonas abiertas dentro de las viviendas. Solo en La Capilla-BC se observó la presencia de vacas, cerdos, pavos y caballos; en las otras tres localidades no se observó presencia de estos animales. El ganado estaba en corrales ubicados a 20 metros de la casa y los perros habían sido desparasitados seis meses antes del censo. No hubo diferencias significativas entre los años de registro (**Figura 2**).



**Figura 2. Proporción de humanos y animales vertebrados registrados en los sitios de recolecta.** El tamaño de las barras representa la abundancia de los animales y humanos que pueden ser posibles hospederos para las hembras de *Anopheles*. En el eje X se presentan las localidades: La Capilla-BC, Villa Grande-BC, San Antonio-PAC, Córdoba-PAC y años de recolecta. El humano fue el vertebrado más abundante.

### Abundancia de hembras de *Anopheles* recolectadas en reposo

Del total de las hembras de *Anopheles* recolectadas con malla polisombra, el 57,8% de las hembras fueron encontradas reposando en el lado interno de la malla, en paralelo a la casa; el 42,2% reposaban en el lado externo de la malla, en paralelo al río y carretera en las localidades del Bajo Cauca y al bosque en las localidades del Pacífico Colombiano (**Figura 3**). En general, se observó mayor abundancia de hembras reposando a menos de un metro de distancia de suelo, entre la casa y el bosque, al lado interno de la malla.



**Figura 3. Comportamiento en reposo de hembras de *Anopheles*.** En círculos se representa las hembras de *Anopheles* del lado interno y externo de la malla polisombra. Las flechas indican la dirección de vuelo de las hembras *Anopheles*. Imagen de autoría propia, basada en fotografías tomadas en campo.

## Hospederos que son fuentes de alimentación para las hembras de *Anopheles*

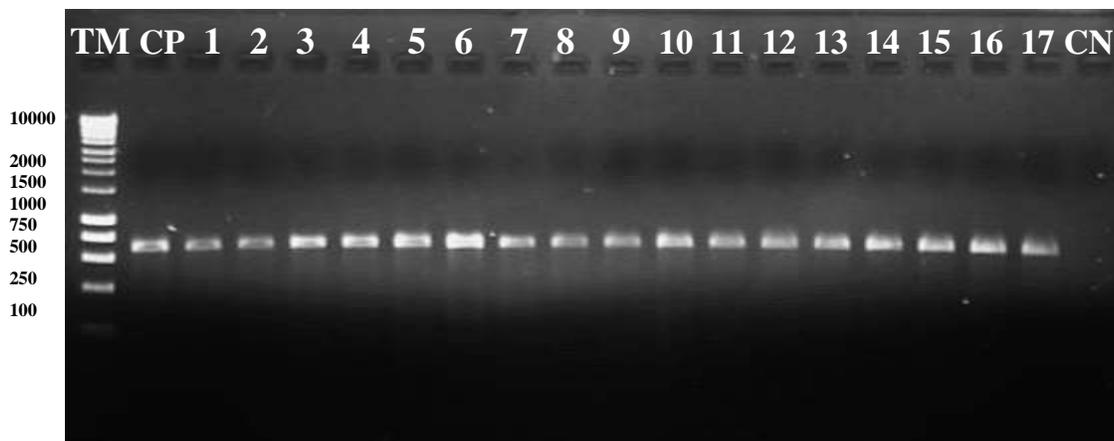
Se procesaron 426 intestinos de hembras *Anopheles* recolectadas con malla polisombra y, se detectó por las PCRs *CYB* y *COI* el ADN de los hospederos que sirvieron como fuente de alimentación de sangre. Del total de muestras analizadas (426), 99 amplificaron una región de *CYB* para vertebrados mamíferos (**Figura 4**) y en 68 de las mismas muestras se logró amplificar la región *COI* (**Figura 5**). El 30% de los amplicones *COI* fueron secuenciados por Sanger para confirmar la identidad del hospedero detectado por métodos moleculares (**Tabla 3**).



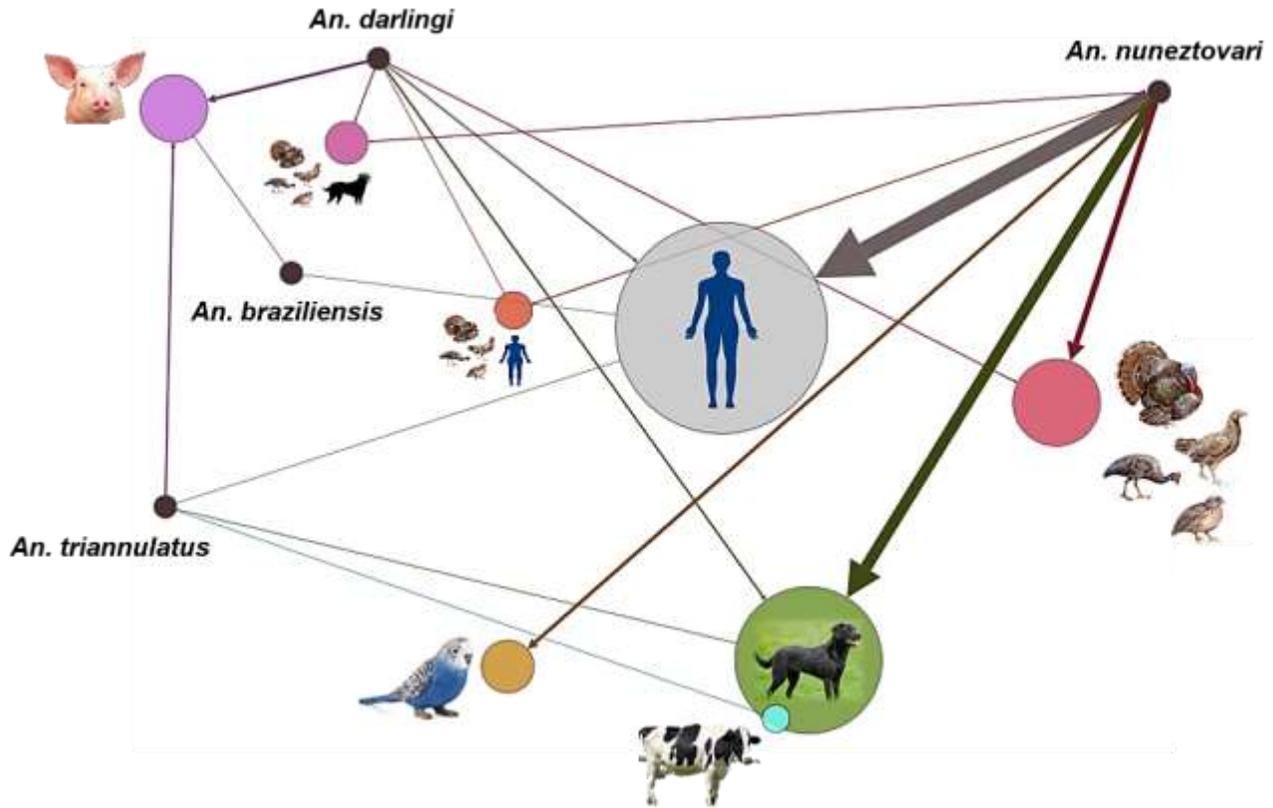
**Figura 4. Hospederos mamíferos fuente de alimentación para las hembras de *Anopheles*.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra los productos de amplificación por **PCR-CYB**. **TM:** Marcador de tamaño molecular GeneRuler de 100 pb. **H:** Control positivo: ADN de humano. **B:** Control positivo: ADN de vaca. **P:** Control positivo: ADN de cerdo. **D:** Control positivo: ADN de perro. **CN:** Control negativo: ADN extraído de intestino de machos de *Anopheles*. **Carril 1-8:** Muestras de Córdoba y San Antonio-PAC. **Carril 9-17:** Muestras de La Capilla y Villa Grande-BC.

Los hospederos detectados incluyen a los vertebrados mamíferos: humano (38,4%), perro (25,3%), cerdo (9,1%) y vaca (1%); el humano fue el más frecuentemente detectado para las especies *An. nuneztovari* y *An. braziliensis* de Villa Grande-BC, *An. nuneztovari* de Córdoba-PAC y *An. darlingi* de San Antonio-PAC; la sangre de vaca solo fue detectada en *An. triannulatus* de La Capilla-BC, siendo este hospedero el menos frecuente (**Figura 6**). Entre los vertebrados, para la clase Aves, se detectaron hospederos principalmente del orden Galliformes (13,1%) en *An. darlingi* y *An. nuneztovari* y en menor

proporción, Passeriformes (6,1%) únicamente detectados en la especie *An. nuneztovari*. Además, se detectó una proporción total de un 7% de alimentaciones mixtas por Galliformes/humano en *An. darlingi* y *An. nuneztovari* de las localidades de PAC; y Galliformes/perro detectado en *An. darlingi* de Villa Grande-BC y *An. nuneztovari* de Córdoba-PAC (**Figura 6**).



**Figura 5. Hospederos mamíferos fuente de alimentación para las hembras de *Anopheles*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra los productos de amplificación por **PCR-COI**. **TM:** Marcador de tamaño molecular GeneRuler de 1 Kb. **CP:** Control positivo de ADN extraído de sangre humana. **CN:** Control negativo: ADN extraído de intestino de machos de *Anopheles*. **Carril 1-8:** Muestras de Córdoba y San Antonio-PAC. **Carril 9-17:** Muestras de La Capilla y Villa Grande-BC.



**Figura 6. Red de interacción cuantitativa de los hospederos de las hembras *Anopheles*.** En círculos de colores se muestran los hospederos que constituyen la fuente de alimentación con sangre para las hembras *Anopheles*. El tamaño de los círculos representa la abundancia de los hospederos identificados. Las líneas rectas representan la relación entre las especies de *Anopheles* y los hospederos como fuente de alimentación con sangre. El grosor de las líneas representa la frecuencia de alimentación con sangre de un hospedero. Gráfico realizado en programa Gephi versión 9.02. Las imágenes fueron tomadas del programa Biorender y Pinterest.

**Tabla 3. Hospederos mamíferos identificados como fuentes de sangre para las hembras de *Anopheles* de acuerdo con la amplificación de *CYB* y secuenciación de *COI*.**

Especie de <i>Anopheles</i>	Región <i>CYB</i> (pb)	Región <i>COI</i> (pb)	Identidad de secuencia <i>COI</i>	Ubicación en malla polisombra
<i>An. darlingi</i>	334	664	<i>Homo sapiens</i>	Bosque - Casa
<i>An. darlingi</i>	453	664	<i>Sus scrofa</i>	Casa - Corral
<i>An. darlingi</i>	453	664	<i>Sus scrofa</i>	Casa - Corral
<i>An. darlingi</i>	453	664	<i>Sus scrofa</i>	Casa - Corral
<i>An. nuneztovari</i>	680	664	<i>Canis lupus familiaris</i>	Casa - Bosque
<i>An. nuneztovari</i>	680	664	<i>Canis lupus familiaris</i>	Casa - Bosque
<i>An. nuneztovari</i>	680	664	<i>Canis lupus familiaris</i>	Casa - Bosque

<i>An. nuneztovari</i>	334	664	<i>Homo sapiens</i>	Casa - Carretera
<i>An. nuneztovari</i>	334	664	<i>Homo sapiens</i>	Casa - Bosque
<i>An. nuneztovari</i>	334	664	<i>Homo sapiens</i>	Casa - Bosque
<i>An. nuneztovari</i>	334	664	<i>Homo sapiens</i>	Casa - Bosque
<i>An. nuneztovari</i>	334	664	<i>Homo sapiens</i>	Casa - Bosque
<i>An. triannulatus</i>	334	664	<i>Homo sapiens</i>	Casa - Bosque
<i>An. triannulatus</i>	680	664	<i>Canis lupus familiaris</i>	Casa - Bosque
<i>An. triannulatus</i>	453	664	<i>Sus scrofa</i>	Casa - Corral
<i>An. triannulatus</i>	453	664	<i>Sus scrofa</i>	Casa - Corral
<i>An. triannulatus</i>	453	664	<i>Sus scrofa</i>	Casa - Corral
<i>An. triannulatus</i>	561	664	<i>Bos taurus</i>	Corral - Casa

*Homo sapiens*: Humano. *Canis lupus familiaris*: Perro de la familia labrador. *Sus scrofa*: Cerdo. *Bos taurus*: Vaca.

### Índices que determinan la elección de un hospedero como fuente de alimentación de sangre

El **Índice de Sangre Humana-ISH** varió dependiendo de las especies en las localidades. El ISH más alto fue para los vectores principales, *An. nuneztovari* y *An. darlingi*; para *An. nuneztovari* el ISH fue de 40% en La Capilla-BC, 57,1% en Villa Grande-BC, y 49,2% en Córdoba-PAC. El ISH para *An. darlingi* fue de 20% en La Capilla-BC y 50% en San Antonio-PAC. *Anopheles braziliensis* de Villa Grande-BC, se detectó alimentado solo de humanos, por lo cual se evidencia un ISH del 100%. Finalmente, para la especie *An. triannulatus* se observó un ISH de 16,7%, siendo este el ISH más bajo (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Índice de sangre humana e índice de forraje para las especies de *Anopheles* recolectadas en cuatro localidades del Bajo Cauca y Pacífico colombiano.

Región	Localidad	Especie de <i>Anopheles</i>	ISH (%)	Índice de Forraje (IF)					
				Humano	Perro	Cerdo	Vaca	Gall	Pass
BC	La Capilla	<i>An. darlingi</i>	20	0,6	2,3	8,6	0	0,6	-
		<i>An. nuneztovari</i>	40	1,1	6,9	0	0	0	-
		<i>An. triannulatus</i>	16,7	0,5	1,9	8,6	0,5	0	-
		<i>An. braziliensis</i>	0	0	0	17,3	0	0	-
	Villa Grande	<i>An. darlingi</i>	0	0	4,9	-	-	2	-
		<i>An. nuneztovari</i>	57,1	0,9	2,8	-	-	0	-
		<i>An. braziliensis</i>	100	1,6	0	-	-	0	-

PAC	San Antonio	<i>An. nuneztovari</i>	0	0	0,5	-	-	6,3	-
		<i>An. darlingi</i>	50	0,9	0	-	-	5,5	-
	Córdoba	<i>An. nuneztovari</i>	49,2	0,6	5,8	-	-	1,3	-

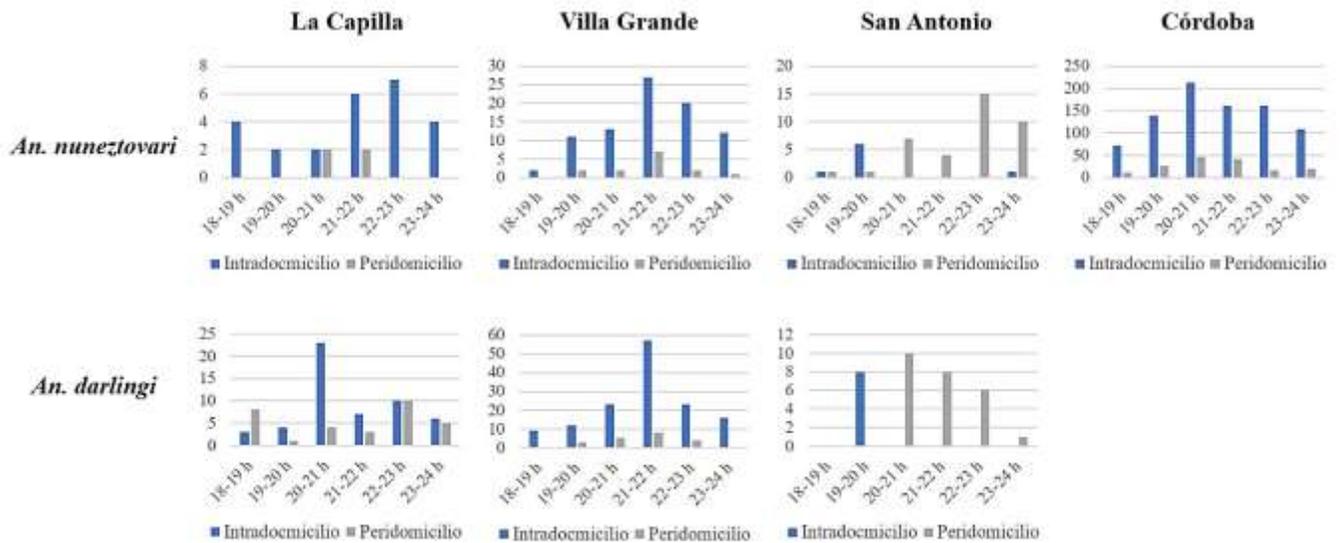
BC: Bajo Cauca. PAC: Pacífico colombiano. ISH: Índice de sangre humana. IF: Índice de forraje. Gall: Galliformes. Pass: Passeriformes.

**El Índice de Forraje-IF** muestra la preferencia que tienen las hembras de *Anopheles* para alimentarse con sangre de un hospedero u otro. En La Capilla-BC, los IFs para las especies *An. darlingi* (IF= 8,6), *An. triannulatus* (IF= 8,6) y *An. braziliensis* (IF= 17,3) indicaron preferencia de alimentación principalmente con sangre de cerdos; mientras que *An. nuneztovari* se alimentó principalmente con sangre de perros (IF= 6,9). En Villa Grande-BC, *An. darlingi* y *An. nuneztovari* mostraron preferencia para alimentarse con sangre de perros, *An. darlingi* tuvo preferencia por sangre de Galliformes (IF= 2) y *An. braziliensis* prefirió al humano como su principal hospedero (IF= 1,6). En San Antonio-PAC, los vectores principales *An. darlingi* y *An. nuneztovari* prefirieron la sangre de los vertebrados del orden Galliformes con un IF=5,5 y IF= 6,3, respectivamente (**Tabla 4**).

### Comportamiento de picadura de las especies *Anopheles*

**Actividad y hora de picadura.** Las especies recolectadas mostraron una actividad de picadura principalmente en el intradomicilio descubierto (espacios de cocina, sala y habitaciones de la casa que estaban descubiertos) y en menor proporción en el peridomicilio. En BC, *An. nuneztovari s.s* tuvo su mayor actividad de picadura en el intradomicilio descubierto, a las 22:00 horas en La Capilla y 21:00 horas en Villa Grande, mientras que en Córdoba-PAC su máximo pico de picadura se presentó a las 20:00 horas. El máximo pico de picadura en el intradomicilio descubierto para *An. darlingi* fue a las 20:00 horas en La Capilla-BC y 21:00 horas en Villa Grande-BC. En contraste, *An. nuneztovari s.s* y *An. darlingi* en San Antonio-PAC tuvieron actividad de picadura principalmente en el peridomicilio, con un

pico máximo de picadura a las 22:00 horas para *An. nuneztovari* s.s y las 20:00 horas para *An. darlingi* (Figura 7).

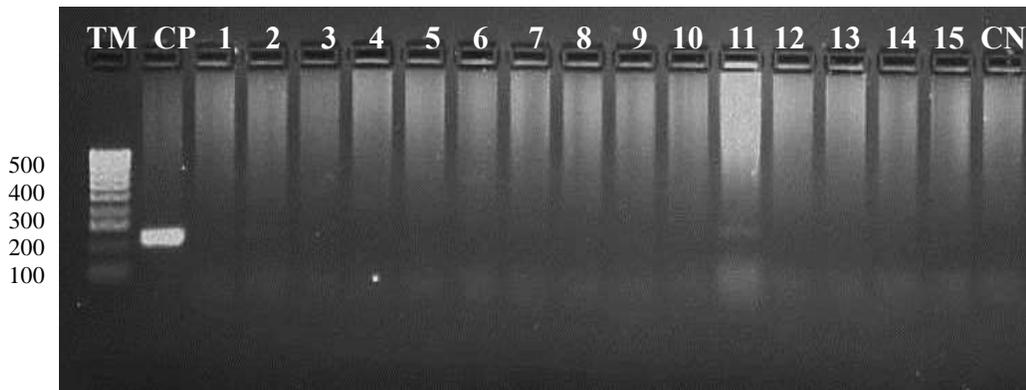


**Figura 7. Actividad y hora de picadura de especímenes *An. nuneztovari* y *An. darlingi* recolectados en las localidades:** La Capilla y Villa Grande en BC, y San Antonio y Córdoba en PAC. En el X se representan la actividad de picadura de las especies por hora. En el eje Y se representa la abundancia de las especies *Anopheles*. En color azul se representa la actividad en el intradomicilio descubierta y en gris la actividad en el peridomicilio de las casas.

Con relación a las especies recolectadas únicamente en La Capilla-BC y Villa Grande-BC, *An. braziliensis* tuvo mayor actividad en el intradomicilio descubierta, con un pico máximo de picadura a las 21:00 horas. En BC solo se recolectaron dos especímenes de *An. triannulatus*, uno en La Capilla, en el peridomicilio y otro en Villa Grande, en el intradomicilio descubierta con actividad de picadura entre las 18:00 y 20:00 horas.

**Tasa de Picadura al Humano-TPH.** La TPH varió dependiendo de la especie y localidad. Para los vectores principales, la TPH más alta fue para *An. nuneztovari* s.s en Córdoba-PAC con 77,5 picaduras por persona por noche (p/p/n) y para *An. darlingi* en Villa Grande-BC con 17,5 p/p/n. Las TPH para las

especies *An. triannulatus* y *An. braziliensis* fueron inferiores a 1,1 p/p/n en La Capilla-BC y Villa Grande-BC (**Tabla 2**).



**Figura 8. Infección natural por *Plasmodium* spp. en *An. nuneztovari*.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% muestra los productos de amplificación por **PCR-anidada**. **TM:** Marcador de tamaño molecular de 100 pb. **CP:** Control positivo, ADN de *P. vivax* extraído de sangre humana. **CN:** Control negativo, agua MQ estéril. **Carril 1-15:** Especímenes *An. nuneztovari* s.s de la localidad de Córdoba-PAC. **Carril 11:** Especímen *An. nuneztovari* s.s positivo para *Plasmodium* sp.

### **Infección natural por *Plasmodium* en especies de *Anopheles***

Se analizaron 1927 especímenes por PCR anidada y PCR-*COXIII* para determinar infección por *Plasmodium* sp. Dos mosquitos *An. nuneztovari* s.s estaban infectados por *Plasmodium* en la localidad de Córdoba-PAC, de los cuales solo uno pudo ser confirmado por PCR anidada específica de la especie *P. vivax* (**Figura 8**). La tasa de infección estimada para el período fue de 0,496% (**Tabla 2**). No se detectó infección natural por *Plasmodium* spp. en especímenes de ninguna de las especies recolectadas en las localidades de BC. Además, la Tasa de Inoculación Entomológica-TIE se registró para la localidad de Córdoba-PAC con 25 picaduras infectivas por año, por el vector *An. nuneztovari*.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este estudio evidencia los hospederos de los cuales las hembras de *Anopheles* se alimentan con sangre y los indicadores entomológicos relacionados con la transmisión de *Plasmodium* en zonas endémicas del Bajo Cauca y Pacífico colombiano. En Latinoamérica, varios estudios han reportado los hospederos por los cuales algunas especies de *Anopheles* tienen preferencia para alimentarse de sangre (61,81,106); sin embargo, este es el primer trabajo que muestra las fuentes de sangre para las especies de *Anopheles* recolectadas en áreas endémicas de Colombia.

Entre las especies encontradas, *An. darlingi* fue la más abundante en las localidades de BC, mientras que *An. nuneztovari* s.s fue la más abundante en PAC. Ambas especies han sido encontradas ampliamente distribuidas en las regiones endémicas del país, con diferencias en abundancia entre localidades (20,22,23). Su presencia y abundancia ha sido asociada a áreas de cultivos a pequeña escala, ganadería, piscicultura y minería a cielo abierto (12,20,24), actividades socioeconómicas características de las localidades de estudio, las cuales generan hábitats larvales que favorecen a las poblaciones de vectores (12). Sin embargo, es común que *An. darlingi* use zonas inundadas en los márgenes del bosque como hábitats larvales (20); mientras que *An. nuneztovari* s.s puede estar asociado a criaderos artificiales y temporales con vegetación, como zonas de pastos inundadas que, favorecidos por las actividades antrópicas y los periodos de transición, de seco a lluvioso, favorecen la presencia de estados inmaduros (40). Además, la presencia de las especies *An. triannulatus* y *An. braziliensis* en BC, concuerdan con los reportes previos de la región y su presencia ha sido asociada a estanques piscícolas (20) y a los animales de corral (44,47).

Las fuentes de alimentación preferidas para las especies de este estudio, *An. darlingi*, *An. nuneztovari* s.s, *An. triannulatus* y *An. braziliensis*, corresponden a animales vertebrados diferentes al humano. Los índices de sangre humana detectados confirmaron el comportamiento antropofílico de los vectores principales; sin embargo, al analizar los índices de forraje, los cuales dan cuenta de la preferencia de elección de los hospederos para cada especie de *Anopheles*, se observaron preferencias específicas por hospederos diferentes al humano. Teniendo en cuenta el registro previo de humanos y animales en la localidad, se observó preferencia de *An. darlingi* por los porcerdos, perros y Galliformes, lo cual había sido previamente reportado por otros trabajos, pero en lugares diferentes a las regiones endémicas de Colombia; por ejemplo, en Perú, donde se documentó preferencia para alimentarse en mayor proporción con sangre de aves Galliformes en vez del humano (61). Esta elección o preferencia puede ser explicada por un factor genético del vector, que le permite orientarse por color, temperatura y CO<sub>2</sub>, (107,108). Además, factores externos como la disponibilidad y abundancia de los hospederos influyen en la selección de fuentes de sangre para los *Anopheles*, como se evidenció en *An. nuneztovari*, *An. albitarsis*, *An. triannulatus* y *An. oswaldoi* de Venezuela (105) y *An. darlingi* de Perú (61). También, las preferencias de hospederos pueden variar según la localidad y el hábitat de las especies de *Anopheles* (80,106), ya que las áreas urbanas o rurales pueden facilitar la aparición de posibles hospederos para las especies. Los hospederos de las especies *An. nuneztovari* y *An. triannulatus* de Venezuela fueron evaluados, usando el método de ELISA (105); se encontró sangre de perros, vacas y humanos. Estos hospederos también fueron detectados en el presente estudio, donde se observó preferencia de *An. nuneztovari* s.s por los perros y adicionalmente, a *An. triannulatus* alimentándose de sangre de vacas.

Adicionalmente, se observó que las hembras recolectadas por el método de malla polisombra se encontraron principalmente reposando en el lado interno de la malla, que indica una dirección de vuelo desde la casa a reposar en el exterior. Este comportamiento, supone una orientación de vuelo de las

hembras que se han alimentado con sangre de hospederos que se encuentran en o cercanos a la casa y salen a reposar en el exterior para la postura de huevos (64).

La tasa de picadura al humano varió entre especies y localidad, siendo mayor para los vectores *An. nuneztovari* s.s en Córdoba-PAC y *An. darlingi* en Villa Grande-BC. Esto sugiere que una persona tiene mayor riesgo de picadura por la especie *An. nuneztovari* s.s en las localidades del Pacífico, que en las localidades del Bajo Cauca. Mientras que, en las localidades de BC el principal riesgo de picadura es por *An. darlingi*. Estos resultados concuerdan con reportes previos que indican un comportamiento principalmente antropofílico para ambas especies, en las regiones de estudio (31,32,42). La tasa de picadura al humano anteriormente reportada para *An. nuneztovari* s.s en PAC osciló entre 0,2-8,6 p/p/n (12,32,40); sin embargo, en este estudio, para esta especie, se encontró una TPH de 77,5 p/p/n en Córdoba-PAC, ubicándola como la TPH más alta para la región. En este estudio, el mayor riesgo de picadura para el humano encontrado puede deberse a las actividades económicas realizadas que exponen al humano a la picadura o a la ineficacia de las medidas de control, ya que los toldillos impregnados con insecticidas que estaban en las casas mostraban deterioro (Observación en campo). Además, la tendencia a un comportamiento de picadura en el intradomicilio descubierto es probablemente influenciado por las actividades de las personas en las horas de la noche, que por las condiciones y/o características de la vivienda, espacios internos de la casa al descubierto, facilitan el paso de los mosquitos hembra que los pican en su búsqueda por fuentes de sangre para la ovoposición (40). El anterior comportamiento, también fue observado en las recolectas realizadas en malla polisombra; las hembras fueron recolectadas reposando principalmente al lado interno de la malla, entre la casa y la carretera y la casa y el bosque, principalmente; lo anterior sugiere un comportamiento de picadura y alimentación de sangre en la casa y dirección de los mosquitos que luego de picar salen a reposar en exteriores.

La infectividad natural de *An. nuneztovari* s.s por *P. vivax* en Córdoba-PAC evidencia el papel que tiene como vector en la localidad. Este hallazgo e información sobre su comportamiento son datos importantes para enfocar las medidas de control vectorial a esta especie, con el fin de reducir el riesgo de transmisión de *Plasmodium*. Además, la detección de infección en tórax sugiere la presencia de las formas parasitarias de esporozoítos, las cuales son infectivas para los humanos. La especie *An. nuneztovari* s.s ha sido reportada infectada ampliamente en el país. En localidades pertenecientes a los departamentos de Córdoba (31,40) y Antioquia, en el noroccidente de Colombia (32,40) fue reportada infectada con *P. vivax*. Adicionalmente en Buenaventura-PAC, se reportó infección natural en *An. nuneztovari* por *P. vivax* variantes VK210 y VK247 (32) y posteriormente, por *Plasmodium* spp. en la localidad de Córdoba-PAC (44). Por tanto, nuestro hallazgo sugiere que *An. nuneztovari* s.s continúa teniendo un papel importante en la transmisión de este parásito en dicha localidad.

Finalmente, este estudio proporciona evidencia del riesgo que existe para los humanos que habitan la localidad de Córdoba en el Pacífico, de ser infectados con *Plasmodium* al recibir una picadura por mosquitos pertenecientes a la especie *An. nuneztovari*. Lo anterior, sustentado en la alta abundancia del vector, el comportamiento antropofílico, su alto índice de sangre humana, la tasa de infección para el periodo (0,496%) y la tasa de inoculación entomológica estimada para la localidad de Córdoba-PAC, la cual fue de 25 picaduras infectivas por año. Para las localidades La Capilla-BC, Villa Grande-BC y San Antonio-PAC, no fue posible detectar la infección natural por *Plasmodium*. Este resultado no sorprende, dadas las tasas de infección que son normalmente detectadas para los vectores principales, en estudios de este tipo realizados en Colombia, las cuales varían entre 0,06 y 1,5 (23,32,47), incluso analizando un mayor número de mosquitos como se realizó en el trabajo de Gutiérrez *et al.* (2008), en que se recolectaron 12.189 mosquitos (23). Por ello, se recomienda realizar estudios que colecten mosquitos por tiempos más prolongados y frecuentes; además de evaluar otras localidades endémicas con el fin de

lograr un mayor cubrimiento y conocimiento de la infectividad natural por *Plasmodium* en los vectores responsables de la transmisión en estas áreas endémicas. Aunque no se detectó infección natural en todas las especies de las localidades evaluadas, la transmisión de *Plasmodium* se evidencia en el número de casos de malaria que anualmente se reportan al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (3), la confirmación de la presencia y abundancia del vector, la actividad antropofílica y los estudios previos han descrito la competencia vectorial que tienen algunas especies para transmitir *Plasmodium*, como es el caso de *An. darlingi* (31,42).

## CONCLUSIONES

1. La abundancia de *An. darlingi* en el Bajo Cauca y *An. nuneztovari* s.s en el Pacífico colombiano, y la alta tasa de picadura, principalmente en el intradomicilio descubierto, sugiere un alto riesgo de picadura para las personas que realizan actividades en estas áreas de la casa durante la noche.
2. La detección de infección natural por *Plasmodium* sp. en *An. nuneztovari* de Córdoba-PAC evidencia el papel que tiene esta especie como un importante vector en esta localidad. Este resultado constituye información útil para dirigir medidas de control efectivas, de acuerdo con la bionomía de esta especie.
3. La tasa de inoculación entomológica de 25 picaduras infectivas por año, en Córdoba-PAC, es un indicativo del riesgo de transmisión de malaria que existe para la localidad; lo cual estaría favorecido por la alta abundancia de *An. nuneztovari* s.s en el intradomicilio descubierto, su comportamiento antropofílico y su competencia para transmitir *Plasmodium*.
4. La fuente de alimentación más frecuentemente detectada para las especies *An. nuneztovari* s.s y *An. darlingi* fue la sangre de humanos; lo que evidencia su comportamiento antropofílico e indica un alto riesgo de picadura y de transmisión para los habitantes de estas zonas. Sin embargo, la

preferencia de *An. nuneztovari* s.s para alimentarse de sangre de perros y *An. darlingi* de sangre de cerdos, perros y Galliformes, antes que el humano, inferida de los índices de forraje mayor a 1, sugiere que la abundancia y disponibilidad del hospedero influyen en la elección de una fuente para la alimentación con sangre.

5. Estos resultados sobre los indicadores entomológicos y el comportamiento de alimentación de las hembras de *Anopheles* permiten conocer cuáles son las especies que están participando en la transmisión de malaria y tener una mayor comprensión de cuál es la dinámica de la enfermedad en las localidades endémicas evaluadas. Además, este trabajo aporta a la vigilancia entomológica, brindando información valiosa que puede usarse para orientar intervenciones de control efectivas, dirigidas a minimizar el contacto humano-vector de acuerdo a la bionomía de las especies.

### **LIMITACIONES**

En la realización de este trabajo se encontraron dificultades por motivos de la Pandemia Covid-19, orden público y condiciones climáticas en las localidades de estudio, que impidieron recolectar un mayor número de especímenes. Se recomienda que en investigaciones futuras se realicen muestreos en otras localidades endémicas de las regiones del estudio para ampliar el panorama sobre los hospederos de *Anopheles* y la infectividad natural por *Plasmodium*.

### **PERSPECTIVAS**

A partir de los estudios y resultados presentados en esta tesis de maestría, las perspectivas de trabajos futuros se enfocan en las siguientes direcciones:

1. Investigaciones futuras que continúen la vigilancia de vectores no solo en las localidades evaluadas en el presente estudio sino en otras localidades endémicas para malaria en Colombia.

2. Reportes nacionales sobre los hospederos que constituyen la fuente de alimentación de las hembras de *Anopheles* en áreas endémicas de malaria en Colombia.
3. Determinación de la infección por parásitos *Plasmodium* en los hospederos vertebrados, identificados como la fuente de alimentación para las especies de *Anopheles*, y su influencia en la propagación de la enfermedad.
4. Realización de investigaciones en campo que evalúen la aplicación de una estrategia basada en zooprofilaxis y el efecto después del uso, para determinar si esta medida alterna de prevención y control de la malaria puede ser recomendada.
5. Educación a la comunidad sobre la importancia de su participación activa para lograr la efectividad y sostenibilidad en el tiempo, de las medidas de control de malaria comúnmente utilizadas y otras medidas propuestas como el uso de zooprofilaxis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Código 2017-16344, Comité para el Desarrollo de la Investigación-CODI, Universidad de Antioquia, Convocatoria Programática, Áreas de la Salud. Y recibió apoyo del proyecto Código 753-218, financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación en Colombia-COLCIENCIAS.

Este trabajo recibió acompañamiento de la Dra. Lina Gutiérrez, Dr. Nelson Naranjo y Dr. Giovan Gómez quienes hicieron parte de mi comité asesor; de la Dra. Margarita M. Correa O, guía clave en mi proceso de aprendizaje; y recibió apoyo de la Dra. Jan Conn y Sara Bickersmith, Griffin Laboratory, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY. Además, contó con el apoyo del Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, el cual permitió mi

formación profesional y abrió sus puertas para ser parte de un excelente equipo de trabajo. Extiendo los agradecimientos a Dios, mi familia y amigos, que me acompañaron para llegar hasta aquí.

### **GRADO DE ORIGINALIDAD**

Este es el primer estudio que muestra los hospederos que constituyen la fuente de sangre para las especies de *Anopheles* recolectadas en áreas endémicas de Colombia.

## REFERENCIAS

1. WHO, Global Malaria Programme. World Malaria Report. World Health Organization. 2020 [cited 2021 Jul 29];1–299. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>
2. PAHO. Pan-American Health Organization. 2020; Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2632:2010-interactive-malaria-statistics&Itemid=2130&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2632:2010-interactive-malaria-statistics&Itemid=2130&lang=es)
3. INS, Sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila). Instituto Nacional de Salud. Inst Nac Salud [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 29];1–29. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020\\_Boletin\\_epidemiologico\\_semana\\_53.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_53.pdf)
4. González R, Carrejo N. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia, claves taxonómicas y notas de distribución. Santiago Cali. 2007; Jan 1.
5. González R. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Segunda edición. Valle P editorial U del, editor. Cali. Colombia; 2009.
6. Gonzalez Obando R, Carrejo Gironza NS. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: claves y notas de distribución. Programa Editor Univalle. 2018. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/18842>.
7. Gómez GF, Cienfuegos A V, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM. Analisis morfologico y molecular evidencia problemas al identificar *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) por claves dicotomicas. Revista Colombiana de Entomología. 2010; 36:68. <https://link.gale.com/apps/doc/A237940843/IFME?u=anon~c56cbc11&sid=googleScholar&xid>

=029231fa.

8. Gómez GF, Correa MM. Discrimination of Neotropical *Anopheles* species based on molecular and wing geometric morphometric traits. *Infection Genetic and Evolution*. 2017;54:379–86. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134817302575>.
9. Targett GAT. *Malaria: Principles and Practice of Malariology*. W. H. Wernsdorfer & I. McGregor, 1989. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2048 pp. Price £195.00. ISBN 0 443 02417 0. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990 Mar 1;84(2):200. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90252-A](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90252-A).
10. Gómez GF, Bickersmith SA, González R, Conn JE, Correa MM. Molecular Taxonomy Provides New Insights into *Anopheles* Species of the Neotropical Arribalzagia Series. *PLoS One*. 2015 Mar 16;10(3):e0119488-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119488>.
11. Orjuela LI, Ahumada ML, Avila I, Herrera S, Beier JC, Quiñones ML. Human biting activity, spatial–temporal distribution and malaria vector role of *Anopheles calderoni* in the southwest of Colombia. *Malaria Journal*. 2015;14(1):256. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4477298/>.
12. Naranjo-Díaz N, Altamiranda M, Luckhart S, Conn JE, Correa MM. Malaria Vectors in Ecologically Heterogeneous Localities of the Colombian Pacific Region. *PLoS One*. 2014;9(8):e103769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103769>.
13. González R, Carrejo N, Wilkerson RC, Alarcon J, Alarcon-Ormasa J, Ruiz F, et al. Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 2010 Dec;105(8).

14. Harrison BA, Ruiz-Lopez F, Falero GC, Savage HM, Pecor JE, Wilkerson RC. *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*. 2012 Mar 1;3218:1–17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26726290>.
15. Quiñones M, Suárez M, Rodríguez A, Fleming GA, Galvis LE. Comportamiento de *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* zavortink, 1973 y su discriminación como posible vector de malaria en el departamento del Tolima Colombia (1). *Biomédica*. 1984 Mar 1;4(1).
16. Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton Y-M. Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101:617–23.
17. Orjuela LI, Herrera M, Erazo H, Quiñones ML. Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con *Plasmodium*. *Biomédica*. 2012 Aug 15;33(1).
18. Shaw WR, Catteruccia F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature Microbiology*. 2018/08/27. 2019 Jan;4(1):20–34. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30150735>.
19. Ogola E, Villinger J, Mabuka D, Omondi D, Orindi B, Mutunga J, et al. Composition of *Anopheles* mosquitoes, their blood-meal hosts, and *Plasmodium falciparum* infection rates in three islands with disparate bed net coverage in Lake Victoria, Kenya. *Malaria Journal*. 2017 Sep 8;16(1):360. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886724>.
20. Naranjo-Díaz N, Altamiranda-Saavedra M, Correa MM. *Anopheles* species composition and entomological parameters in malaria endemic localities of North West Colombia. *Acta Tropica*.

2019;190:13–21. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17313712>.

21. Hernández-Valencia JC, Rincón DS, Marín A, Naranjo-Díaz N, Correa MM. Effect of land cover and landscape fragmentation on anopheline mosquito abundance and diversity in an important Colombian malaria endemic region. *PLoS One*. 2020 Oct 15;15(10):e0240207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240207>.
22. Olano V, Brochero H, Sáenz R, Quiñones M, Molina J. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud*. 2001 Jan 1;21:402-8.
23. Gutiérrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, et al. Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*. 2008;107(2):99–105. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08001101>.
24. Gutiérrez LA, Naranjo NJ, Cienfuegos A V, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, et al. Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria Journal*. 2009;8(1).
25. Olano V, Carrasquilla G, Mendez F. Transmission of urban malaria in Buenaventura, Colombia: entomological features. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 1997/04/01. 1997;1(4):287–94.
26. Bejarano EE. Occurrence of the malaria Vector *Anopheles albimanus* Wiedemman (Diptera: Culicidae) in Isla Fuerte, Colombia. *Neotrop Entomol*. 2003 Sep;32(3).
27. Solarte Y, Hurtado C, Gonzalez R, Alexander B. Man-biting activity of *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* and *An. (Kerteszia) neivai* (Diptera: Culicidae) in the Pacific Lowlands of Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91:141–6.

28. Díaz AS, Sotelo AI, González-Uribe C, Brochero HL. Bionomía de *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* (Diptera: Culicidae) en dos rancherías del pueblo wayúu, Riohacha, La Guajira, Colombia. *Biomédica*. 2017 Mar 29;37(Sup2):201–7. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3481>.
29. Frederickson EC. Bionomics and control of *Anopheles albimanus*. Technical Paper - Pan American Health Organization. Washington, DC: Panam American Health Organization. 1993; 76.
30. Christian Frederickson E, Panamericana de la Salud O, Mundial de la Salud O. Bionomia y control de *Anopheles Albimanus* / E. Christian Federickson. 2019.
31. Gutiérrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, et al. Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Córdoba and Antioquia states in northwestern Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(8):1117–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3066193/>.
32. Naranjo-Díaz N, Sallum MAM, Correa MM. Population dynamics of *Anopheles nuneztovari* in Colombia. *Infection Genetic and Evolution*. 2016;45:56–65. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134816303562>.
33. Mirabello L, Conn JE. Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. *Medical and Veterinary Entomology*. 2008 Jun 1;22(2):109–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00731>.
34. Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TMP, Nagaki SS, Sant’Ana DC, et al. Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *PLoS One*.

2013/02/04. 2013;8(2):e54063–e54063. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23390494>.

35. Scarpassa VM, Cunha-Machado AS, Saraiva JF. Evidence of new species for malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato in the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal*. 2016 Apr 12;15:205. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27068120>.
36. Calado DC, Foster PG, Bergo ES, Santos CLS dos, Galardo AKR, Sallum MAM. Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in the Brazilian Amazon. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(8):791–9. <http://europepmc.org/abstract/MED/19148419>.
37. Scarpassa VM, Conn JE. Mitochondrial DNA detects a complex evolutionary history with Pleistocene Epoch divergence for the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato. *American Journal and Tropical Medicine Hygiene*. 2011/11/04. 2011;85(5):857–67.
38. Galardo AK, Arruda M, D’Almeida Couto AA, Wirtz R, Lounibos LP, Zimmerman RH. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *American Journal and Tropical Medicin Hygiene*. 2007/03/16. 2007;76(3):461–9.
39. Conn JE, Vineis JH, Bollback JP, Onyabe DY, Wilkerson RC, Povoia MM. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. *American Journal and Tropical Medicin Hygiene*. 2006/05/12. 2006;74(5):798–806.
40. Naranjo-Diaz N, Rosero DA, Rua-Uribe G, Luckhart S, Correa MM. Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasites & Vectors*. 2013;6(1):61. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-61>.
41. Altamiranda-Saavedra M, Conn JE, Correa MM. Genetic structure and phenotypic variation of *Anopheles darlingi* in northwest Colombia. *Infection Genetic and Evolution*. 2017;56:143–51.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481730391X>.

42. Naranjo-Díaz N, Conn JE, Correa MM. Behavior and population structure of *Anopheles darlingi* in Colombia. *Infection Genetic and Evolution*. 2016;39:64–73. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481630003X>.
43. Dye C. Vectorial capacity: Must we measure all its components? *Parasitology Today*. 1986;2(8):203–9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475886900827>.
44. Montoya C, Bascuñán P, Rodríguez-Zabala J, Correa MM. Abundance, composition and natural infection of *Anopheles* mosquitoes from two malaria-endemic regions of Colombia. *Biomédica*. 2017;37:98–105.
45. Fajardo P, Alzate A. *Anopheles nuneztovari* como vector de malaria en el Bajo Calima, Buenaventura, Colombia. *Colomb Medica*. 1987;18:14–8.
46. Quintero L, López MB, Ramírez H, Castaño JC. Descripción de un brote epidémico de malaria en una comunidad indígena asentada en la zona urbana de Armenia, Colombia, 2012. *Biomédica*. 2015 Mar 1;35(1):24–33. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2195>.
47. Rosero DA, Naranjo-Diaz N, Alvarez N, Cienfuegos A V, Torres C, Luckhart S, et al. Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) naturally infected with *Plasmodium* spp. *ISRN Parasitology*. 2013;2013:927453. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27335865>.
48. Collins FH, Zavala F, Graves PM, Cochrane AH, Gwadz RW, Akoh J, et al. First Field Trial of an Immunoradiometric Assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes. *American Journal and Tropical Medicin Hygene*. 33(4):538–43. <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/33/4/article-p538.xml>.

49. 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 Heal Organ*. 1987/01/01. 1987;65(1):39–45.
50. Wirtz RA, Sattabongkot J, Hall T, Burkot TR, Rosenberg R. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Plasmodium vivax*-VK247 sporozoites. *Journal of Medical Entomology*. 1992 Sep 1;29(5):854–7. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.5.854>.
51. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *American Journal and Tropical Medicin Hygene*. 1999/05/29. 1999;60(4):687–92.
52. Echeverry DF, Deason NA, Makuru V, Davidson J, Xiao H, Niedbalski J, et al. Fast and robust single PCR for *Plasmodium* sporozoite detection in mosquitoes using the cytochrome oxidase I gene. *Malaria Journal*. 2017;16(1):230. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1881-1>.
53. Hasan AU, Suguri S, Sattabongkot J, Fujimoto C, Amakawa M, Harada M, et al. Implementation of a novel PCR based method for detecting malaria parasites from naturally infected mosquitoes in Papua New Guinea. *Malaria Journal*. 2009;8(1):182. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-182>.
54. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson Jr RB, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 May;43(5):2435–40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15872277>.
55. Laroche M, Almeras L, Pecchi E, Bechah Y, Raoult D, Viola A, et al. MALDI-TOF MS as an innovative tool for detection of *Plasmodium* parasites in *Anopheles* mosquitoes. *Malaria Journal*. 2017;16(1):5. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1657-z>.
56. Zhou G, Kohlhepp P, Geiser D, Frasquillo M del C, Vazquez-Moreno L, Winzerling JJ. Fate of

- blood meal iron in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 2007;53(11):1169–78.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002219100700145X>.
57. Pappa V, Reddy M, Overgaard HJ, Abaga S, Caccone A. Estimation of the Human Blood Index in malaria mosquito vectors in Equatorial Guinea after indoor antivektor interventions. *American Journal and Tropical Medicin Hygene*. 2011 Feb;84(2):298–301.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292902>.
58. Muturi EJ, Mwangangi JM, Beier JC, Blackshear M, Wauna J, Sang R, et al. Ecology and Behavior of *Anopheles arabiensis* in Relation to Agricultural Practices in Central Kenya. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2013 Sep 1;29(3):222–30.  
<https://doi.org/10.2987/13-6328R.1>.
59. Mahande A, Mosha F, Mahande J, Kweka E. Feeding and resting behaviour of malaria vector, *Anopheles arabiensis* with reference to zoophylaxis. *Malaria Journal*. 2007;6(1):100.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-100>.
60. Kent RJ, Thuma PE, Mharakurwa S, Norris DE. Seasonality, Blood Feeding Behavior, and transmission of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles arabiensis* after an Extended Drought In Southern Zambia. *American Journal and Tropical Medicin Hygene*. 2007;76(2):267–74.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4152308/>.
61. Moreno M, Saavedra MP, Bickersmith SA, Prussing C, Michalski A, Tong Rios C, et al. Intensive trapping of blood-fed *Anopheles darlingi* in Amazonian Peru reveals unexpectedly high proportions of avian blood-meals. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017 Feb 23;11(2):e0005337. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005337>.
62. Oliveira CD de, Tadei WP, Abdalla FC, Pimenta PFP, Marinotti O. Multiple Blood Meals in

- Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Journal of Vector Ecology. 2012 Dec;37(2):351–8.
63. Iwashita H, Dida GO, Sonye GO, Sunahara T, Futami K, Njenga SM, et al. Push by a net, pull by a cow: can zooprophyllaxis enhance the impact of insecticide treated bed nets on malaria control? Parasites & Vectors. 2014;7(1):52.
64. Burkot TR, Russell TL, Reimer LJ, Bugoro H, Beebe NW, Cooper RD, et al. Barrier screens: a method to sample blood-fed and host-seeking exophilic mosquitoes. Malaria Journal. 2013;12(1):49.
65. Shahhosseini N, Friedrich J, Moosa-Kazemi SH, Sedaghat MM, Kayedi MH, Tannich E, et al. Host-feeding patterns of Culex mosquitoes in Iran. Parasites & Vectors. 2018 Dec 27;11(1):669. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30587194>.
66. Das S, Henning TC, Simubali L, Hamapumbu H, Nzira L, Mamini E, et al. Underestimation of foraging behaviour by standard field methods in malaria vector mosquitoes in southern Africa. Malaria Journal. 2015;14(1):12.
67. Das S, Muleba M, Stevenson JC, Pringle JC, Norris DE. Beyond the entomological inoculation rate: characterizing multiple blood feeding behavior and *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection in *Anopheles* mosquitoes in northern Zambia. Parasites & Vectors. 2017;10(1):45. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1993-z>.
68. Massebo F, Balkew M, Gebre-Michael T, Lindtjørn B. Blood meal origins and insecticide susceptibility of *Anopheles arabiensis* from Chano in South-West Ethiopia. Parasites & Vectors. 2013;6(1):44. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-44>.
69. Mucci LF, Júnior RPC, de Paula MB, Scandar SAS, Pacchioni ML, Fernandes A, et al. Feeding habits of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an area of sylvatic transmission of yellow fever in the

state of São Paulo, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2015 Mar;21:6.

70. Ngom EHM, Ndione J-A, Ba Y, Konaté L, Faye O, Diallo M, et al. Spatio-temporal analysis of host preferences and feeding patterns of malaria vectors in the sylvo-pastoral area of Senegal: impact of landscape classes. *Parasites & Vectors*. 2013;6(1):332. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-332>.
71. Niare S, Berenger J-M, Dieme C, Doumbo O, Raoult D, Parola P, et al. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. *Malaria Journal*. 2016;15(1):87.
72. Kent RJ, Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *American Journal and Tropical Medicine Hygiene*. 2005 Aug;73(2):336–42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16103600>.
73. Reeves LE, Holderman CJ, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE. Maintenance of host DNA integrity in field-preserved mosquito (Diptera: Culicidae) blood meals for identification by DNA barcoding. *Parasites & Vectors*. 2016;9(1):503.
74. Lutomiah J, Omondi D, Masiga D, Mutai C, Mireji PO, Ongus J, et al. Blood meal analysis and virus detection in blood-fed mosquitoes collected during the 2006-2007 Rift Valley fever outbreak in Kenya. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2014 Sep;14(9):656–64. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25229704>.
75. Logue K, Keven JB, Cannon M V, Reimer L, Siba P, Walker ED, et al. Unbiased Characterization of *Anopheles* Mosquito Blood Meals by Targeted High-Throughput Sequencing. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Mar 10;10(3):e0004512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004512>.

76. Keven JB, Reimer L, Katusele M, Koimbu G, Vinit R, Vincent N, et al. Plasticity of host selection by malaria vectors of Papua New Guinea. *Parasites & Vectors*. 2017;10(1):95. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2038-3>.
77. Hikosaka K, Watanabe Y, Kobayashi F, Waki S, Kita K, Tanabe K. Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. *Parasitology International*. 2011;60(2):175–80. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138357691100016X>.
78. Hikosaka K, Kita K, Tanabe K. Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum Apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2013;188(1):26–33. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685113000315>.
79. De Carvalho GC, dos Santos Malafrente R, Miti Izumisawa C, Souza Teixeira R, Natal L, Marrelli MT. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. *Journal of Vector Ecology*. 2014 Jun 1;39(1):146–52. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12081.x>.
80. Flores-Mendoza C, Cunha RA, Rocha DS, Lourenço-de-Oliveira R. Determinação das fontes alimentares de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, pelo teste de precipitina. *Rev Saude Publica*. 1996;30:129–34.
81. Escobar D, Ascencio K, Ortiz A, Palma A, Sánchez A, Fontecha G. Blood Meal Sources of *Anopheles* spp. in Malaria Endemic Areas of Honduras. *Insects*. 2020 Jul 16;11(7):450. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32708582>.
82. Ulloa A, González-Cerón L, Rodríguez Mh. Host Selection And Gonotrophic Cycle Length Of *Anopheles Punctimacula* in Southern Mexico. *Journal American of Mosquito Control Association*. 2006 Dec 1;22(4):648–53. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[648:HSAGCL\]2.0.CO](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[648:HSAGCL]2.0.CO).
83. Lardeux F, Loayza P, Bouchité B, Chavez T. Host choice and human blood index of *Anopheles*

*pseudopunctipennis* in a village of the Andean valleys of Bolivia. *Malaria Journal*. 2007;6(1):8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-8>.

84. Cohnstaedt LW, Alfonso-Parra C, Fernandez-Salas I. Mosquito Vector Biology and Control in Latin America—A 27th Symposium. *Journal of American Mosquito Control Association*. 2017 Sep 1;33(3):215–24. <https://doi.org/10.2987/17-6653.1>.
85. Wernsdorfer WH. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica*. 1994;56(2):143–56. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0001706X94900604>.
86. Gentile JE, Rund SSC, Madey GR. Modelling sterile insect technique to control the population of *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*. 2015;14(1):92. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0587-5>.
87. Coelho WMD, de Carvalho Apolinário Coelho J, Bresciani KDS, Buzetti WAS. Biological control of *Anopheles darlingi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae using shrimps. *Parasite Epidemiology Control*. 2017 May 22;2(3):91–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29774286>.
88. Orduz S, Rojas W, Correa MM, Montoya AE, de Barjac H. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *Journal Invertebrate Pathology*. 1992;59(1):99–103. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002220119290118N>.
89. Kroeger A, Horstick O, Riedl C, Kaiser A, Becker N. The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropica*. 1995;60(1):47–57. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0001706X9500101J>.
90. Dambach P, Louis VR, Kaiser A, Ouedraogo S, Sié A, Sauerborn R, et al. Efficacy of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasites & Vectors*. 2014;7(1):371. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-371>.

91. Wilke ABB, Marrelli MT. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasites & Vectors*. 2015;8(1):342. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0959-2>.
92. Bogh C, Clarke SE, Pinder M, Sanyang F, Lindsay SW. Effect of passive zooprophylaxis on malaria transmission in The Gambia. *Journal of Medical Entomology*. 2002/01/05. 2001;38(6):822–8.
93. Keven JB, Artzberger G, Gillies ML, Mbewe RB, Walker ED. Probe-based multiplex qPCR identifies blood-meal hosts in *Anopheles* mosquitoes from Papua New Guinea. *Parasites & Vectors*. 2020;13(1):111. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3986-6>.
94. Álvarez N, Gómez GF, Naranjo-Díaz N, Correa MM. Discrimination of *Anopheles* species of the Arribalzagia Series in Colombia using a multilocus approach. *Infection Genetic and Evolution*. 2018;64:76–84. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134818304118>.
95. Zapata MA, Cienfuegos A V, Quirós OI, Quiñones ML, Luckhart S, Correa MM. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Uraba, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;77(1):67–72. <http://europepmc.org/abstract/MED/17620632>.
96. Stone C, Gross K. Evolution of host preference in anthropophilic mosquitoes. *Malaria Journal*. 2018;17(1):257.
97. Garrett-Jones C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bulletin World Health Organization*. 1964;30(2):241–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2554803/>.
98. Cienfuegos A V, Rosero DA, 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 Tropica*. 2011/02/21. 2011 May;118(2):128–35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21345325>.

99. Rosero DA, Gutiérrez LA, Cienfuegos AV, Jaramillo L, Correa MM. Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología*. 2010;36:260–3. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882010000200015&nrm=iso.04882010000200015&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882010000200015&nrm=iso.04882010000200015&nrm=iso)
100. Ngo KA, Kramer LD. Identification of Mosquito Bloodmeals Using Polymerase Chain Reaction (PCR) With Order-Specific Primers. *Journal of Medical Entomology*. 2003 Mar 1;40(2):215–22. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.215>.
101. Reeves LE, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018 Aug 30;12(8):e0006767. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006767>.
102. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012 Jun 15;28(12):1647–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
103. Echeverry DF, Deason NA, Davidson J, Makuru V, Xiao H, Niedbalski J, et al. Human malaria diagnosis using a single-step direct-PCR based on the *Plasmodium* cytochrome oxidase III gene. *Malaria Journal*. 2016;15(1):128. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1185-x>.
104. Diakité NR, Guindo-Coulibaly N, Adja AM, Ouattara M, Coulibaly JT, Utzinger J, et al. Spatial and temporal variation of malaria entomological parameters at the onset of a hydro-agricultural

development in central Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*. 2015;14(1):340.  
<https://doi.org/10.1186/s12936-015-0871-4>.

105. Rubio-Palis Y, Curtis Cf, Gonzales C, Wirtz Ra. Host choice of anopheline mosquitoes in a malaria endemic area of western Venezuela. *Medical and Veterinary Entomology*. 1994 Jul 1;8(3):275–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00509.x>.
106. Santos CS, Pie MR, da Rocha TC, Navarro-Silva MA. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. *PLoS One*. 2019 Feb 19;14(2):e0212517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212517>.
107. Kemibala EE, Mafra-Neto A, Saroli J, Silva R, Philbert A, Ng'habi K, et al. Is *Anopheles gambiae* attraction to floral and human skin-based odours and their combination modulated by previous blood meal experience?. *Malaria Journal*. 2020 Sep 1;19(1):318.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32873302>.
108. Russell TL, Beebe NW, Bugoro H, Apairamo A, Cooper RD, Collins FH, et al. Determinants of host feeding success by *Anopheles farauti*. *Malaria Journal*. 2016;15(1):152.  
<https://doi.org/10.1186/s12936-016-1168-y>.

## ANEXOS

**Anexo A.** Protocolo de amplificación por PCR para la región MT-CYB de hospederos vertebrados mamíferos.

Propósito: identificar los hospederos vertebrados mamíferos de los cuales las hembras de *Anopheles* se alimentaron, mediante la amplificación de una región del marcador mitocondrial *CYB*, su confirmación por electroforesis y posterior secuenciación.

<i>Reactivos PCR</i>	<i>Concentración</i>	<i>uL</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
<i>taq Buffer</i>	10X	2,5	95°C	5 min
<i>dNTP mix</i>	5 mM	2	95°C	1 min
<b>Primers</b>			58°C	1 min
<i>UNREV 1025</i>		0,3	72°C	1 min
<i>Pig 573F</i>		0,3	72°C	7 min
<i>Human 741F</i>	10 mM	0,3		
<i>Dog 368F</i>		0,3		
<i>Cow 121F</i>		0,3		
<i>Goat 894F</i>		0,3		
<i>MgCl2</i>	50 mM	2,5		
<i>TaqPol</i>	5 U/uL	0,13		
<i>Agua</i>	-	14,07		
<i>ADN</i>	-	2		
<b>Total</b>		<b>25</b>		

<i>Electroforesis</i>	
<i>Agarosa</i>	2%
<i>Marcador</i>	GeneRuler 100 pb
<i>Tinción</i>	Bromuro de etidio
<i>Condiciones</i>	60 Voltios, 80 min

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Tamaño con UNREV1025 (pb)</i>
<i>Pig573F</i>	CCTCGCAGCCGTACATCTC	453
<i>Cow121F</i>	CATCGGCACAAATTTAGTCG	561
<i>Human741F</i>	GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT	334
<i>Goat894F</i>	CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCTC	132
<i>Dog368F</i>	GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT	680
<i>UNREV1025</i>	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	—

Referencias:

1. Kent, R. J., & Norris, D. E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2), 336–342. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.336>

**Anexo B.** Protocolo de amplificación por PCR para la región MT-CYB de hospederos vertebrados aves.

Propósito: identificar los hospederos aviares de los cuales las hembras de *Anopheles* se alimentaron, mediante la amplificación de una región del marcador mitocondrial citocromo B-CYB, su confirmación por electroforesis y posterior secuenciación. Esta PCR permite diferenciar entre Galliformes, Passeriformes y Columbiformes.

<i>Reactivos PCR</i>	<i>Concentración</i>	<i>uL</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
<i>Taq Buffer</i>	10X	2,5	95°C	5 min
<i>dNTP mix</i>	5 mM	1	94°C	30 seg
<b>Primers</b>			65°C	30 seg <b>49 ciclos</b>
<i>Galliform F</i>		0,3	72°C	1 min
<i>Galliform R</i>		0,3	72°C	4 min
<i>Passeriform F</i>	10 mM	0,3		
<i>Passeriform R</i>		0,3		
<i>Columbiform F</i>		0,3		
<i>Columbiform R</i>		0,3		
<i>MgCl2</i>	25 mM	3		
<i>TaqPol</i>	5 U/uL	0,13		
<i>Agua</i>	-	13,57		
<i>ADN</i>	-	3		
<i>Total</i>		<b>25</b>		

<i>Electroforesis</i>	
<i>Agarosa</i>	2%
<i>Marcador</i>	GeneRuler 100 pb
<i>Tinción</i>	Bromuro de etidio
<i>Condiciones</i>	60 Voltios, 80 min

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Tamaño (pb)</i>
<i>Galliformes F</i>	ATTTCCGGCTCCCTATTAGCAG	210 pb
<i>Galliformes R</i>	GTCCGATGTGAAGGAAGATACAGATGAAGAAGAA	
<i>Passeriformes F</i>	RGCMCTRGCHGCCTCMRTCCTAG	165 pb
<i>Passeriformes R</i>	AAYGGGTGTTCKACTGGTTGGCT	
<i>Columbiformes F</i>	CTMACMGGMYTACTACTMGCCG	333 pb
<i>Columbiformes R</i>	GGTTTGCCAATGTAGGGGAC	

**Referencias:**

1. Ngo, K. A., & Kramer, L. D. (2003). Identification of Mosquito Bloodmeals Using Polymerase Chain Reaction (PCR) with Order-Specific Primers. *Journal of Medical Entomology*, 40(2), 215–222. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.215>



**Anexo D.** Número de humanos y animales presentes en los sitios de recolecta de acuerdo al censo realizado en cada una de las visitas a las localidades.

	<b>BAJO CAUCA</b>				<b>PACÍFICO COLOMBIANO</b>				<b>Total</b>
	El Bagre				Istmina		Buenaventura		
	<b>La Capilla</b>		<b>Villa Grande</b>		<b>San Antonio</b>		<b>Córdoba</b>		
	2018	2020	2019	2020	2018	2021	2018	2018	
<b>Humano</b>	22	28	29	31	25	23	50	45	253
<b>Gallina</b>	9	6	11	13	3	4	7	9	62
<b>Perro</b>	6	6	6	4	3	3	12	11	51
<b>Vaca</b>	20	22	0	0	0	0	0	0	42
<b>Gato</b>	1	1	2	2	1	1	3	4	15
<b>Cerdo</b>	5	3	0	0	0	0	0	0	8
<b>Pavo</b>	3	3	0	0	0	0	0	0	6
<b>Caballo</b>	1	1	0	0	0	0	0	0	2
<b>Total</b>	67	70	48	50	32	31	72	69	<b>439</b>