

## Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia

Astrid V. Cienfuegos<sup>1</sup>, Giovan F. Gómez<sup>1</sup>, Liliana A. Córdoba<sup>1</sup>, Shirley Luckhart<sup>2</sup>, Jan E. Conn<sup>3</sup>, Margarita M. Correa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Colombia. <sup>2</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California, Davis, CA, USA. <sup>3</sup>Griffin Laboratory, The Wadsworth Center, New York State, Department of Health, Albany, NY, USA

### RESUMEN

**Introducción.** La dificultad en la identificación de especies anofelinas, debido a la variación intraindividual y similitud interespecífica, ha conducido al desarrollo de herramientas moleculares que permitan la discriminación de especies.

**Objetivo.** Utilizar herramientas bioinformáticas para desarrollar una PCR-RFLP *in silico* que permita la identificación molecular de especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* registradas en Colombia, y evaluar la utilidad de la PCR-RFLP-*AluI* desarrollada previamente en nuestro laboratorio, en anofelinos de diferentes localidades.

**Material y Métodos.** Se realizó un análisis bioinformático utilizando las secuencias ITS2 del Grupo *Oswaldoi* reportadas en GenBank, para generar patrones de restricción *in silico* que permitieran discriminar estas especies. Para evaluar la PCR-RFLP-*AluI* se utilizaron mosquitos colectados en las localidades de Nuquí, Pizarro, Buenaventura y Tumaco, en la Costa Pacífica de Colombia.

**Resultados.** El análisis bioinformático mostró que la enzima *AluI* produjo patrones de restricción *in silico* diferentes para cuatro especies del Grupo *Oswaldoi*; dos especies más podrían distinguirse con una segunda digestión. La PCR-RFLP-*AluI* permitió confirmar los resultados de la identificación morfológica y evidenciar algunos

problemas de identificación que surgen debido a la variación intraespecífica y similitud interespecie.

**Conclusiones.** La ampliación de la estrategia de PCR-RFLP-*AluI* y su aplicación en diferentes zonas del país, permitirá la discriminación rápida y confiable de un mayor número de mosquitos, entre los cuales se encuentran especies de difícil discriminación morfológica. Esta estrategia será de utilidad para el desarrollo de estudios complementarios que permitan un mayor acercamiento al entendimiento de la dinámica de la transmisión de malaria en Colombia.

**Palabras clave:** *Anopheles*, Análisis de secuencias de ADN, Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

### SUMMARY

**Design and evaluation of ITS2 PCR-RFLP based methods for molecular identification of mosquitoes *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) from the Pacific Coast of Colombia**

**Introduction.** Difficulties in anopheline identification due to intra-individual variation and interspecies similarity have led to the development of molecular tools that allow species discrimination.

**Solicitud de sobretiros:** Margarita M. Correa. Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108, Bloque 5-430, Medellín, Colombia. Teléfono: (574) 219-5494, Fax: (574) 219-5498. E-mail: mcorrea@quimbaya.udea.edu.co

**Recibido:** el 25 de septiembre de 2007. **Aceptado para publicación:** el 14 de abril de 2008.

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081915.pdf>

**Objective.** To use bioinformatics tools to develop a PCR-RFLP assay for molecular identification of species belonging to the *Oswaldoi* Group reported in Colombia and to evaluate the usefulness of a PCR-RFLP-*AluI* assay previously developed in our lab, in anophelines from different Colombian localities.

**Material and Methods.** *In silico* restriction patterns were generated by bioinformatics analysis of ITS2 sequences reported in GenBank, corresponding to species belonging to the *Oswaldoi* Group. To evaluate the PCR-RFLP-*AluI* assay we used mosquitoes collected in four localities of the Pacific Coast of Colombia: Nuquí, Pizarro, Buenaventura and Tumaco.

**Results.** Bioinformatic analysis of reported ITS2 sequences showed that the enzyme *AluI* produced *in silico* restriction patterns that distinguished four species belonging to the *Oswaldoi* Group; two additional species could be differentiated with a second digest. The evaluation of the PCR-RFLP-*AluI* confirmed results of morphological identifications and demonstrated identification problems that can arise due to intraspecific variation and interspecies similarity.

**Conclusions.** The expansion of the PCR-RFLP-*AluI* methodology and its application in different regions of the country will allow rapid and accurate discrimination of a large number of mosquitoes, some of them belonging to species that are difficult to discriminate morphologically. This strategy will be useful for complementary studies to assess malaria transmission dynamics in Colombia.

**Key words:** *Anopheles*, DNA Sequence Analysis, Restriction Fragment Length Polymorphism, Polymerase Chain Reaction.

## INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países con mayor incidencia de malaria en Latinoamérica (1); durante el año 2007, se reportaron 109,277 casos de malaria en el país, la mayoría en la región del Urabá, Bajo Cauca y Alto Sinú (2). La situación

de malaria en Colombia ha permanecido estable desde comienzos de los años 90 hasta finales del año 2005, período en el cual se registraron más de 100,000 casos de malaria anuales (1).

En Colombia se han reportado alrededor de 43 especies de *Anopheles*, entre las cuales, basados en información epidemiológica y detección natural del parásito en poblaciones de mosquitos, se consideran como vectores primarios de la enfermedad *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, *Anopheles (Nys.) darlingi* Root y *Anopheles (Nys.) nuneztovari* Gabaldón; y como vectores secundarios *Anopheles (Anopheles) punctimacula* Dyar & Knab, *Anopheles (Ano.) pseudopunctipennis* Theobald, *Anopheles Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab y *Anopheles (Ker.) lepidotus* Zavortink (3). Recientemente, *Anopheles rangeli* (Nys.) Gabaldón, Cova Garcia, y López y *Anopheles oswaldoi* (Nys.) (Peryassú) han sido incriminados en la transmisión de malaria en el departamento del Putumayo, al sur de Colombia (4). Tradicionalmente las especies anofelinas han sido identificadas utilizando caracteres morfológicos en sus diferentes estadios (5-7). Sin embargo, en muchos casos las características de la hembra no permiten la identificación de los anofelinos debido a la alta similitud interespecie y variación intraespecífica, presente en especies cercanas filogenéticamente o especies hermanas, y especies morfológicamente indistinguibles o especies crípticas (3). De las 15 especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* (8), en Colombia han sido registradas seis especies: *An. nuneztovari* y *An. rangeli*, consideradas especies hermanas (5, 9), *An. oswaldoi*, *Anopheles (Nys.) benarrochi* Gabaldón, *Anopheles (Nys.) aquasalis* Curry y *Anopheles (Nys.) strodei* Root; estas especies presentan dificultad en su identificación, debido al traslapo morfológico existente en los caracteres de la hembra (9-11). Las especies morfológicamente indistinguibles o especies crípticas usualmente presentan diferencias en aspectos biológicos, como la preferencia de hospederos, hábitos de reposo, tipo de criaderos, sitios y hora de picadura, que

### Identificación molecular de *Anopheles* spp.

pueden afectar su capacidad para transmitir enfermedad (12-14); por esto, ha sido necesario utilizar métodos diferentes que permitan la identificación correcta de especies. Entre estas alternativas, el análisis de la morfología de huevos ha mostrado utilidad para la determinación de especies del subgénero *Nyssorhynchus* (15, 16), incluyendo algunas especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi*, *An. benarrochi*, *An. oswaldoi* y *An. rangeli* (17). Otra alternativa utilizada para la identificación de especies similares es la obtención de estados inmaduros; sin embargo, éste es un proceso laborioso y no siempre exitoso. Debido a las dificultades que se presentan durante la identificación morfológica, se ha justificado el desarrollo de técnicas moleculares sencillas, rápidas, confiables y económicas, que permitan conocer la importancia de las distintas especies pertenecientes a un grupo o complejo en la transmisión de la malaria (18-23). Zapata y col. (24) reportaron recientemente una PCR-RFLP, basada en el espaciador interno transcrito 2 del ADN ribosomal (ITS2), para la identificación de siete especies anofelinas colectadas en la localidad de San Pedro de Urabá, ubicada en una de las regiones con mayor transmisión de malaria en Colombia (25). Esta PCR-RFLP permite identificar los principales vectores reportados en Colombia, *An. albimanus*, *An. nuneztovari* y *An. darlingi*, una especie considerada vector secundario, *An. punctimacula* (3), y vectores regionales, como *An. rangeli*, o de importancia local en otras regiones de Latinoamérica, como *Anopheles (Nys.) triannulatus* (Neiva y Pinto) (26).

En nuestro trabajo se utilizaron herramientas bioinformáticas disponibles para seleccionar enzimas de restricción que permitieran desarrollar una PCR-RFLP para la identificación molecular de las especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* registradas en Colombia. Nuestra estrategia permitirá diferenciar, en adición a las dos especies del Grupo *Oswaldoi* discriminadas por la PCR-RFLP de Zapata y col. (24), las otras cuatro especies de este grupo encontradas en Colombia. En este estudio también se evaluó la aplicabilidad de la

PCR-RFLP-*AluI* desarrollada por Zapata y col. (24) en la identificación de mosquitos provenientes de diferentes municipios de la Costa Pacífica. Esta metodología fue estandarizada en mosquitos colectados en una sola localidad al noroccidente del país, por lo que se consideró importante determinar su aplicabilidad como herramienta diagnóstica en otros lugares de Colombia. Sería importante poder ampliar esta metodología para utilizarla en diferentes zonas del país en la identificación molecular de un mayor número de especies, varias de ellas de difícil discriminación por caracteres morfológicos y de importancia médica en áreas endémicas para malaria.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Análisis bioinformático de secuencias ITS2 de especies del Grupo *Oswaldoi*.** Para la realización de los análisis bioinformáticos se utilizó el programa NEBcutter V2.0 (27) y secuencias ITS2 de especies del Grupo *Oswaldoi* reportadas en GenBank y algunas obtenidas en nuestro laboratorio (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1**  
Secuencias ITS2 de especies del Grupo *Oswaldoi* utilizadas en el análisis bioinformático

Especie	No. de acceso GenBank*
<i>An. aquasalis</i>	DQ020123 a DQ020137, AF462376
<i>An. benarrochi</i>	AF462383, AF462384
<i>An. nuneztovari</i>	AY028081 a AY028126 U92351, U92350, AF461749, L22462 3 secuencias obtenidas por nuestro laboratorio
<i>An. oswaldoi</i>	AF055068 a AF055070, AF056317, AF056318, Y679149 a AY679155, U92344, U92352, U92353
<i>An. rangeli</i>	AF462381, AF462382, Y09239
<i>An. strodei</i>	U92345, U92354

\*Las secuencias del GenBank fueron editadas para incluir sólo las regiones donde alinean los "primers" en los extremos de los genes 5.8S y 28S del ADN ribosomal.

Las secuencias tomadas del GenBank fueron editadas para incluir las regiones donde alinean los "primers" en los extremos de los genes 5.8S y 28S del ADN ribosomal, las cuales equivaldrían al producto de la PCR que se utilizaría en la digestión. En el caso de secuencias que incluían fragmentos 5.8S y 28S más allá del "primer", éstos se eliminaron; y para secuencias más cortas, que no incluían las regiones de alineamiento de los "primers", éstas se adicionaron utilizando secuencias conservadas 5.8S y 28S del ADN ribosomal. La búsqueda de los sitios de restricción se realizó en una secuencia consenso generada por especie después de realizar un alineamiento con ClustalW (28). Inicialmente se seleccionaron las enzimas que producían fragmentos en la secuencia consenso de cada especie y se escogieron aquellas enzimas que generaron patrones de restricción únicos (diferente número y tamaño de bandas), fácilmente discernibles para cada una de las especies analizadas. Finalmente, se analizó si los sitios de restricción de las enzimas seleccionadas presentaban variaciones en alguna de las secuencias de cada especie, analizadas individualmente; esto con el fin de corroborar que el patrón de restricción fuese invariable entre individuos de la misma especie.

**Especímenes utilizados en la evaluación de la PCR-RFLP-*AluI*.** Para la evaluación de la PCR-RFLP-*AluI* desarrollada previamente por Zapata y col. (24), se utilizaron especímenes colectados en cuatro localidades en la Costa Pacífica de Colombia durante los años 2005 y 2006 (Cuadro 2).

**Cuadro 2**  
Especímenes utilizados para la evaluación de la PCR-RFLP-*AluI* en localidades de la Costa Pacífica colombiana

Especie	Número
<i>An. albimanus</i>	20
<i>An. apicimacula</i>	1
<i>An. nuneztovari</i> (3 individuos de isofamilia)	3
<i>An. punctimacula</i>	4
<i>An. rangeli</i>	5
Total	33

En esta región se presentan altas tasas de transmisión de malaria, encontrándose los índices parasitarios anuales (IPA) más elevados en los departamentos de Chocó (IPA=32.8), Valle del Cauca (IPA=11.4) y Nariño (IPA=13.6) (25). Las localidades muestreadas fueron: Pizarro y Nuquí (departamento del Chocó), Buenaventura (Valle del Cauca) y Tumaco (Nariño) (Figura 1). La identificación morfológica de los *Anopheles* colectados se realizó utilizando las claves de identificación disponibles (5-7).



**Figura 1.** Localidades de colección de los especímenes utilizados en la evaluación de la PCR-RFLP-*AluI*. NUQ = Nuquí y PIZ = Pizarro (Departamento del Chocó), BUE = Buenaventura (Valle del Cauca) y TUM = Tumaco (Nariño), ubicados en la Costa Pacífica. SPE = San Pedro de Urabá (Antioquia), ubicado en la región del Urabá, Bajo Cauca y Alto Sinú; localidad donde se colectaron los especímenes utilizados en la estandarización de la PCR-RFLP-*AluI*.

**Extracción y amplificación del ADN.** La amplificación del ADN se realizó a partir de ADN genómico (29) o de una pata del mosquito (24). La región ITS2 fue amplificada con "primers" que hibridan en las regiones conservadas de las subunidades ribosomales 5.8S y 28S, descritos previamente por Beebe & Saul (30). Las condiciones de la reacción han sido descritas por Zapata y col. (24).

## Identificación molecular de *Anopheles* spp.

**Digestión de los productos de PCR.** Los resultados del análisis bioinformático fueron confirmados en el laboratorio utilizando como controles de restricción, productos de amplificación obtenidos a partir de clones de la región ITS2 de especímenes *An. nuneztovari* y *An. darlingi*, de los que se obtuvo respaldo de secuencias (datos sin publicar). La digestión de los amplificados de ITS2 con las enzimas seleccionadas, luego del análisis bioinformático, fue realizada de acuerdo con las condiciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU); la mezcla fue incubada por 4 horas, a 37°C. Los productos de PCR digeridos fueron separados en gel de agarosa al 2% (Bioline, Boston, MA, EEUU), con tinción de bromuro de etidio (5 µg/ml). Los geles fueron visualizados en un transiluminador (UV Transilluminator 2000, BioRad, Hercules, CA, EEUU).

**Evaluación de la PCR-RFLP *AluI*.** La PCR-RFLP descrita por Zapata y col. (24) fue evaluada en todos los mosquitos colectados de cada especie, excepto en *An. albimanus*; debido a la gran cantidad de especímenes colectados de esta especie, se analizaron 20 ejemplares representativos de las localidades, tomados al azar por fecha de colección (**Cuadro 2**). Adicionalmente, la PCR-RFLP *AluI* fue evaluada en varios individuos pertenecientes a una isofamilia *An. nuneztovari* colectada en la localidad de Buenaventura.

## RESULTADOS

**Análisis bioinformático de las secuencias ITS2 de especies del Grupo *Oswaldoi*.** El análisis bioinformático se realizó con las secuencias ITS2 reportadas en GenBank de las especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* registradas en Colombia: *An. aquasalis*, *An. benarrochi*, *An. rangeli*, *An. oswaldoi*, *An. strodei* y *An. nuneztovari*; en el análisis se incluyeron además secuencias de *An. nuneztovari* obtenidas en nuestro laboratorio (**Cuadro 1**). La selección de estas secuencias se realizó considerando el reporte realizado por Marrelli y col. (31), quienes al efectuar un agrupamiento mediante "neighbor-joining" de las secuencias ITS2 reportadas de anofelinos de Latinoamérica, mostraron que algunas especies que eran difíciles de distinguir por morfología, estaban presentes en más de un grupo debido a la similitud de sus secuencias ITS2. Estos autores sugirieron que es posible que existan errores en la identificación que hayan conducido a la introducción equivocada de secuencias ITS2 de varias especies en GenBank. En nuestro trabajo, para evitar resultados confusos, se eliminaron del análisis bioinformático las secuencias que probablemente tenían una asignación de especies incorrecta de acuerdo con el análisis realizado por Marrelli y col. (31). Los resultados más relevantes del análisis bioinformático se presentan en el **Cuadro 3**.

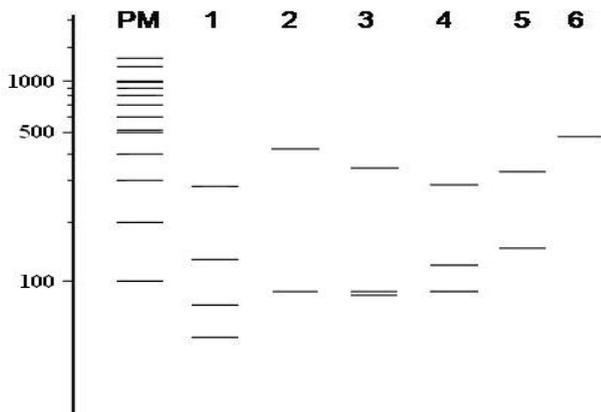
**Cuadro 3**

**Enzimas de restricción y predicción del tamaño de las bandas producidas (en pares de bases), utilizando secuencias ITS2 de especies del Grupo *Oswaldoi*.**

Enzimas	Especies					
	<i>An. aquasalis</i>	<i>An. benarrochi</i>	<i>An. nuneztovari</i>	<i>An. oswaldoi</i>	<i>An. rangeli</i>	<i>An. strodei</i>
<i>AluI</i>	282, 135, 60, 5	423, 83 (341, 83, 76)*	341, 83, 77	284, 125, 83 (367, 125)*	326, 152	488 (Sin corte)
<i>Cac8I</i>	247, 144, 89, 2	250, 193, 58, 5	249, 162, 58, 32	252, 81, 71, 69, 19	245, 89, 79, 50, 15	247, 156, 85
<i>DraIII</i>	284, 198	307, 199	303, 198	291, 201	280, 198	290, 198
<i>FspI</i>	437, 45	407, 99	357, 99, 45	350, 97, 45	433, 45	356, 87, 45
<i>HaeIII</i>	444, 38	306, 158, 38, 4	309, 154, 38	454, 38	440, 38	170, 148, 132, 38

\*El análisis de secuencias individuales de ITS2 mostró dos patrones de restricción para *An. benarrochi* y *An. oswaldoi* (ver texto).

Estos análisis permitieron predecir que la enzima *AluI* podría ser de utilidad para la discriminación de especies del Grupo *Oswaldoi*. Esta enzima presentó el mayor poder de discriminación para separar las especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* analizadas (**Cuadro 3**). El análisis bioinformático mostró que esta enzima produjo patrones *in silico* fácilmente distinguibles para cuatro especies: *An. aquasalis*, *An. oswaldoi*, *An. rangeli* y *An. strodei*. En la **Figura 2** se presentan los patrones que podrían obtenerse utilizando esta enzima. De acuerdo con estos patrones, la enzima *AluI* no presenta sitios de reconocimiento en la región ITS2 de *An. strodei*, por lo que se obtendría una banda de 488 bp, que sugeriría la presencia de esta especie. Para su confirmación podría realizarse una segunda digestión con una de las enzimas evaluadas en este trabajo (**Cuadro 3**).



**Figura 2.** Representación de los patrones de restricción *in silico* producidos por la enzima *AluI* utilizando secuencias ITS2 obtenidas de GenBank, correspondientes a las especies del Grupo *Oswaldoi* registradas en Colombia. Carriles: PM: Peso molecular, 1: *An. aquasalis*, 2: *An. benarrochi*, 3: *An. nuneztovari*, 4: *An. oswaldoi*, 5: *An. rangeli*, 6: *An. strodei*. No se muestran las variaciones de patrón de secuencias individuales de *An. benarrochi* y *An. oswaldoi*.

El análisis de las secuencias consenso y de las secuencias individuales de cada especie, para descartar polimorfismos en las secuencias ITS2 que pudieran afectar la reproducibilidad de los patrones obtenidos con *AluI*, mostró que no existía variabilidad intraespecífica que afectara

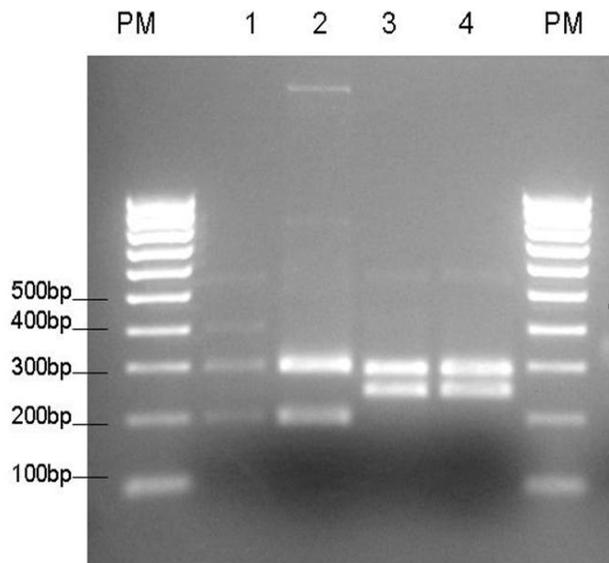
el sitio de restricción en las secuencias de cuatro de las especies analizadas: *An. aquasalis*, *An. nuneztovari*, *An. rangeli* y *An. strodei*. Según este análisis, *An. benarrochi* y *An. oswaldoi* podrían presentar dos patrones de restricción cada uno; esto se debe a una mutación en uno de los dos sitios de restricción de la enzima, presente en algunas de las secuencias individuales. Cualquiera de los dos patrones encontrados en *An. oswaldoi* permite diferenciarlo de las demás especies; sin embargo, uno de los patrones producidos en *An. benarrochi* se puede traslapar con el producido por la enzima en *An. nuneztovari*, por lo que se sugiere realizar una segunda digestión con la enzima *FspI* para discriminarlos.

Las enzimas *Cac8I*, *DraIII*, *FspI* y *HaeIII*, en general, producen tres patrones distinguibles que se pueden traslapar para dos o tres especies (**Cuadro 3**); por lo cual, su utilización no conduciría a la estrategia más práctica para la identificación de las especies.

**Confirmación de patrones obtenidos *in silico*.** Varias de las enzimas seleccionadas con el análisis bioinformático fueron evaluadas experimentalmente, utilizando secuencias ITS2 clonadas provenientes de especímenes *An. nuneztovari* y *An. darlingi*, con respaldo morfológico de isofamilias y series, respectivamente, y que cuentan con respaldo de secuencias. En la **Figura 3** se observan los patrones de restricción obtenidos con la enzima *DraIII*. Estos resultados indicaron que los patrones generados *in silico* para estas dos especies, pueden ser reproducidos y comprobados adecuadamente de forma experimental. De igual forma, los patrones *in silico* obtenidos con la enzima *AluI* en secuencias ITS2 de las especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi*, deberán ser confirmados experimentalmente en el laboratorio.

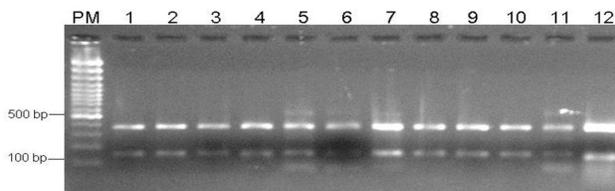
**Evaluación de la PCR-RFLP-*AluI*.** De las siete especies que pudieron ser identificadas utilizando la PCR-RFLP desarrollada por Zapata y col. (24), tres estaban presentes en las localidades de la Costa Pacífica, *An. albimanus*, *An. punctimacula* y *An. rangeli*.

### Identificación molecular de *Anopheles* spp.



**Figura 3. Confirmación del patrón bioinformático obtenido con la enzima *DraIII* utilizando DNA de clones de ITS2. Gel de agarosa al 2%. Carriles: PM: Peso molecular, 1 y 2: *An. nuneztovari* (Grupo *Oswaldoi*), 3 y 4: *An. darlingi* (DNA utilizado como control de la digestión con *DraIII*).**

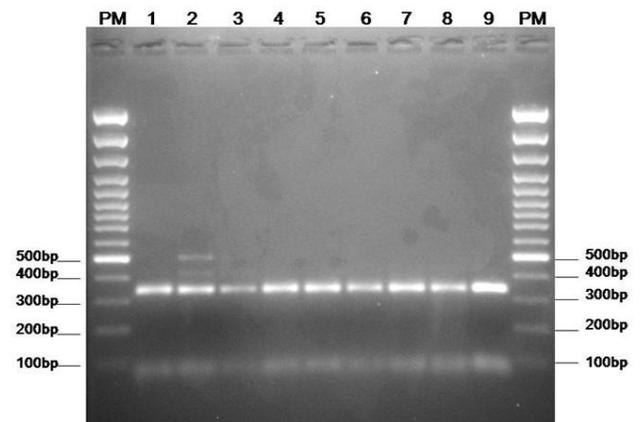
Los patrones de bandas obtenidos para 20 especímenes de *An. albimanus* confirmaron su identificación por caracteres morfológicos (**Figura 4**).



**Figura 4. Confirmación de la identificación morfológica de especímenes *An. albimanus* de la Costa Pacífica por PCR-RFLP-*AluI*. Agarosa al 2%. Carril superior: PM: Peso molecular; 1-11: *An. albimanus*, 12: Control del patrón de *An. albimanus* proveniente de clon con respaldo de secuencia.**

Adicionalmente, con la PCR-RFLP-*AluI* (24), se encontró congruencia entre los patrones de restricción observados en individuos de una isofamilia *An. nuneztovari* colectada en Buenaventura y el de otra obtenida en un estudio previo en San Pedro de Urabá (24), localidad donde se estandarizó inicialmente esta metodología (**Figura 5**). Esta

PCR-RFLP-*AluI* permitió también evidenciar los problemas de identificación que surgen debido a la variación intraespecífica y similitud interespecie. Así, especímenes identificados por morfología como *An. punctimacula*, presentaron un patrón de restricción diferente al reportado para esta especie por Zapata y col. (24); este mismo patrón fue obtenido para el único espécimen identificado como *An. (Ano.) apicimacula* Dyar y Knab. Los especímenes identificados por caracteres morfológicos como *An. rangeli* presentaron un patrón de bandas correspondiente al de *An. nuneztovari* (**Figura 5**). Esta misma situación fue reportada anteriormente por Zapata y col. (24) en San Pedro de Urabá, donde la PCR-RFLP-*AluI* permitió corroborar la identificación morfológica de especies que presentaban traslapo morfológico.



**Figura 5. Evaluación de la PCR-RFLP-*AluI* en especímenes *An. rangeli* y en individuos de isofamilias *An. nuneztovari*. Agarosa al 2%. PM: Peso molecular; 1, 7 y 8: Individuos de isofamilia *An. nuneztovari*, 2-6: especímenes identificados inicialmente por morfología como *An. rangeli*, 9: Control del patrón de *An. nuneztovari* proveniente de un clon con respaldo de secuencia.**

### DISCUSIÓN

La identificación correcta de especies vectores es parte importante en el entendimiento de los aspectos entomológicos de la malaria. El Grupo *Oswaldoi* comprende varias especies similares morfológicamente con comportamiento y capacidad vectorial diferente; por ello, en nuestro trabajo diseñamos una estrategia *in*

*silico* basada en PCR-RFLP-ITS2, con potencial de ser utilizada en la identificación molecular de especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* registradas en Colombia. Los resultados del análisis bioinformático mostraron que la enzima *AluI* produciría patrones fácilmente distinguibles para cuatro de las seis especies del Grupo *Oswaldoi* presentes en Colombia: *An. aquasalis*, *An. oswaldoi*, *An. rangeli* y *An. strodei*. Para la diferenciación de *An. benarrochi* y *An. nuneztovari*, cuyos patrones se podrían traslapar debido a una inserción en el sitio de reconocimiento de la enzima presente en una de las secuencias de *An. benarrochi*, sería necesario realizar una segunda digestión con la enzima *FspI*. Los resultados anteriores demuestran la importancia de utilizar siempre en las reacciones de digestión, muestras control provenientes de individuos con el adecuado respaldo morfológico de series o isofamilias (24); éstos, además de permitir la asignación correcta de especie, contribuirán a la detección de variaciones eventuales que pueden presentarse en la secuencia ITS2 de especímenes colectados en campo. La heterogeneidad intragenómica de las secuencias ITS puede deberse a mutaciones puntuales o a la presencia de repeticiones nucleotídicas (32); éstas pueden causar pequeñas variaciones en el tamaño de los fragmentos, como se observó en algunas de las secuencias al realizar su análisis individualmente.

De igual forma, otras estrategias de PCR-RFLP han sido evaluadas para la discriminación de dos especies dentro de este grupo, el designado *An. benarrochi* B y *An. oswaldoi* (23). Estos autores utilizaron la enzima *HaeIII*, que produce un patrón de dos bandas visibles en *An. benarrochi* B (365, 137, y 38 bp) y sólo una banda visible en *An. oswaldoi* (493 y 38 bp); esto es debido a que la banda de 38 bp generalmente no es evidente en el gel. Por esta razón, al utilizar esta estrategia, para verificar la presencia de corte en el amplificado, es necesario correr paralelamente el producto de PCR. Al utilizar esta enzima durante nuestro análisis bioinformático, se observó que el patrón pro-

ducido para varias especies del Grupo *Oswaldoi* se podría traslapar (**Cuadro 3**). En nuestro trabajo se utilizaron secuencias de *An. benarrochi* reportadas en GenBank (**Cuadro 1**), pero no se analizaron secuencias de *An. benarrochi* B.

La ventaja de la PCR-RFLP diseñada en este trabajo es que, potencialmente, permitiría discriminar un mayor número de especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* que han sido registradas en Colombia; adicionalmente, los patrones obtenidos con esta PCR-RFLP serían fácilmente discernibles. La confirmación de los resultados de nuestro análisis bioinformático deberá realizarse utilizando individuos con el adecuado respaldo morfológico de series, isofamilias, y/o machos, dado los problemas que se presentan durante la identificación morfológica de la hembra en las especies anofelinas del Grupo *Oswaldoi* (9, 23).

Durante la evaluación de la PCR-RFLP-*AluI* en especímenes de la Costa Pacífica, se confirmó la identificación de *An. albimanus* y *An. nuneztovari*, demostrando que la secuencia ITS2 en especímenes provenientes de diferentes regiones de Colombia es lo suficientemente conservada para permitir la aplicación de la técnica en ambas zonas del país.

La PCR-RFLP-*AluI* permitió la identificación correcta de especímenes de discriminación difícil por caracteres morfológicos. Individuos identificados por morfología como *An. rangeli*, correspondieron a *An. nuneztovari* de acuerdo con el patrón de restricción con *AluI*. Esto no fue sorprendente, puesto que ha sido reportado que *An. rangeli* y *An. nuneztovari* son especies hermanas que presentan alta similitud interespecífica (5, 9), por lo que pueden ser identificadas erróneamente usando las claves disponibles (24). En Colombia, estas dos especies cumplen un papel diferente en la transmisión de malaria; *An. nuneztovari* es considerado vector principal a nivel nacional (3) y *An. rangeli* sólo ha sido implicado como vector regional en el sur de Colombia (4). Por esto, se hace necesaria la determinación correcta de estas especies para el diseño de estrategias adecuadas de control.

## Identificación molecular de *Anopheles* spp.

Los especímenes identificados por morfología como *An. punctimacula* y *An. apicimacula* presentaron el mismo patrón de restricción usando la PCR-RFLP-*AluI*. Esto fue debido a que con algunas de las claves disponibles (5-7) puede encontrarse dificultad en la diferenciación de *An. punctimacula*, *An. apicimacula* o *An. (Ano.) neomaculipalpus* Curry. La identificación adecuada de estas especies es importante debido a su papel diferencial en la transmisión de malaria. *An. punctimacula* ha sido reportado como vector secundario de esta enfermedad en Colombia (3) y *An. neomaculipalpus* ha sido incriminado en el estado de Bolívar, Venezuela, donde se encontró con una tasa de infección mayor (0.84%) que la especie considerada como vector principal en la zona (33); además, ha demostrado ser altamente antropofílico en Brasil (34). Contrario a estas especies, *An. apicimacula* no ha sido incriminado como vector de malaria, y ha sido reportado en la mayoría de los departamentos de Colombia. Debido al problema en la identificación de estas especies con algunas de las claves existentes y su papel diferente en la transmisión de la malaria, es necesario contar con herramientas moleculares que permitan su discriminación para conocer con certeza cuál es su distribución y papel como especies vectores en las distintas regiones endémicas de Colombia. En conclusión, la PCR-RFLP-*AluI* basada en la secuencia ITS2, diseñada en este trabajo, es la primera reportada con el potencial de discriminar varias de las especies pertenecientes al Grupo *Oswaldoi* registradas en Colombia; ella contribuirá a expandir el potencial de la PCR-RFLP-*AluI* (24), actualmente utilizada en nuestro laboratorio, para discriminar un número mayor de especies.

Adicionalmente, los resultados obtenidos de la evaluación de la PCR-RFLP-*AluI* de Zapata y col. (24) en localidades de otra región del país demuestran su utilidad en el diagnóstico de especies provenientes de dos regiones de Colombia. Esta PCR-RFLP podría ser utilizada para la identificación rápida y confiable de un gran número de mosquitos pertenecientes a las especies incluidas en la prueba.

Agradecimientos. Los resultados presentados en este trabajo hacen parte de un estudio financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, Universidad de Antioquia (código 8700-039). Los especímenes utilizados fueron colectados en un estudio financiado por COLCIENCIAS (Código: 1115-05-16879). La estudiante AVC recibe apoyo del Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de COLCIENCIAS.

### REFERENCIAS

1. **Roll Back Malaria, World Health Organization, UNICEF.** World Malaria Report. Geneva (Suiza), World Health Organization; 2005. 294 p.
2. **Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública.** SISTEMA DE VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA – SIVIGILA. 2007. Semana Epidemiológica 52.
3. **Olano V, Brochero H, Saenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica* 2001; 21:402-8.
4. **Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton YM.** Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:617-23.
5. **Faran M.** Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the *Albimanus* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contrib Am Entomol Inst* 1980; 15:1-215.
6. **Faran M, Linthicum L.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *Mosq Sys* 1981; 13:1-81.
7. **Suarez M, Quiñones M, Robayo M.** Clave gráfica para la determinación taxonómica de los anofelinos de Colombia. Ministerio de Salud, Dirección de Campañas Directas, División Técnica, Programa Antimalárico 1988.
8. **Harbach RE.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* 2004; 94:537-53.
9. **Calle LD, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo ON.** Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:1191-5.
10. **Quiñones ML, Harbach RE, Calle DA, Ruiz F, Erazo HF, Linton YM.** Variante morfológica de adultos hembras de *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomedica* 2001; 21:351-9.

11. **Sallum MA, Bergo ES, Flores DC, Forattini OP.** Systematic studies on *Anopheles galvaoi* Causey, Deane & Deane from the subgenus *Nyssorhynchus blanchard* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:1177-89.
12. **Djadid ND, Gholizadeh S, Tafsiri E, Romi R, Gordeev M, Zakeri S.** Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. *Malar J* 2007; 6:6.
13. **Fontenille D, Simard F.** Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:357-75.
14. **Walton C, Somboon P, O'Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, Linton YM, et al.** Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infect Genet Evol* 2007; 7:93-102.
15. **Lounibos LP, Duzak D, Linley JR.** Comparative egg morphology of six species of the *Albimanus* section of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1997; 34:136-55.
16. **Sallum MA, Bergo ES, Forattini OP, Flores DC.** The eggs of *Anopheles galvaoi* and *Anopheles evansae*, two species of the subgenus *Nyssorhynchus*. *J Am Mosq Control Assoc* 2002; 18:10-5.
17. **Estrada DA, Quiñones ML, Sierra DM, Calle DA, Ruiz F, Erazo HF, et al.** [Egg morphology as an indirect method to identify *Anopheles benarrochi*, *Anopheles oswaldoi* and *Anopheles rangeli* (Diptera: Culicidae)]. *Biomedica* 2003; 23:388-95.
18. **Alam MT, Das MK, Dev V, Ansari MA, Sharma YD.** Identification of two cryptic species in the *Anopheles (Cellia) annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP. *Parasitol Res* 2007; 100:943-8.
19. **Alam MT, Das MK, Dev V, Ansari MA, Sharma YD.** PCR-RFLP method for the identification of four members of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101:239-44.
20. **Awolola TS, Oyewole IO, Koekemoer LL, Coetzee M.** Identification of three members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group and their role in malaria transmission in two ecological zones in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99:525-31.
21. **Collins FH, Kamau L, Ranson HA, Vulule JM.** Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bull World Health Organ* 2000; 78:1412-23.
22. **Fritz GN, Engman S, Rodriguez R, Wilkerson RC.** Identification of four vectors of human *Plasmodium* spp. by multiplex PCR: *Anopheles rangeli*, *An. strodei*, *An. triannulatus*, and *An. trinkae* (Diptera: Culicidae: *Nyssorhynchus*). *J Med Entomol* 2004; 41:1111-5.
23. **Ruiz F, Quiñones ML, Erazo HF, Calle DA, Alzate JF, Linton YM.** Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:155-60.
24. **Zapata MA, Cienfuegos AV, Quiros 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. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77:67-72.
25. Instituto Nacional de Salud. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. Instituto Nacional de Salud 2006:49-64.
26. **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. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:461-9.
27. **Vincze T, Posfai J, Roberts RJ.** NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3688-91.
28. **EBI.** ClustalW. EBI Tools 2006-2008 [cited 2007; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>]
29. **Ashburner M.** Genomic Extraction. *Drosophila: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989:47-8.
30. **Beebe NW, Saul A.** Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53:478-81.
31. **Marrelli MT, Sallum MA, Marinotti O.** The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy - a critical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:817-32.
32. **Fairley TL, Kilpatrick CW, Conn JE.** Intragenomic Heterogeneity of Internal Transcribed Spacer rDNA in Neotropical Malaria Vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2005; 42:795-800
33. **Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V, Vaccari E.** *Anopheles (Anopheles) neomaculipalpus*: a new malaria vector in the Amazon basin?. *Med Vet Entomol* 2005; 19:329-32.
34. **Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS.** Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:325-35.