

Determinación de especies anofelinas en una localidad endémica de malaria en el departamento de Córdoba, noroeste de Colombia.

María Paulina Aycardi Morinelli^{1*}, Margarita M. Correa², Eloina Zarate Peñata¹, Carolina Padrón Echenique¹

¹Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología, Carrera 6a N° 76-103, Montería, Colombia. E-mail: maycardi_morinelli@hotmail.com

²Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología, Grupo de Microbiología Molecular, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.

Resumen

AYCARDI MP, CORREA M, ZARATE E, PADRÓN C. 2016. Determinación de especies anofelinas en una localidad endémica de malaria en el departamento de Córdoba, noroeste de Colombia. ENTOMOTROPICA 31(36): 294-301.

La malaria es un importante problema de salud pública en Colombia y el departamento de Córdoba presenta un elevado número de casos anuales de malaria en el país. Con el objetivo de determinar la composición de especies anofelinas y su participación en la transmisión de malaria en una localidad endémica de Córdoba, en este trabajo se colectaron mosquitos *Anopheles* en la localidad de Nuevo Tay. Para la confirmación de la especie por caracteres morfológicos, se utilizó una PCR-RFLP-ITS2, se evaluó la infección natural de los mosquitos por *Plasmodium* y su comportamiento de picadura. Se detectaron las especies *An. nuneztovari* s.l., *An. darlingi*, *An. triannulatus* s.l. y *An. albimanus* probables vectores de la malaria en la localidad.

Palabras clave adicionales: *Anopheles*, Colombia, infectividad, malaria, taxonomía.

Abstract

AYCARDI MP, CORREA M, ZARATE E, PADRÓN C. 2016. Determination of anopheline species in a malaria endemic locality in the department of Cordoba, northwest Colombia. ENTOMOTROPICA 31(36): 294-301.

Malaria is a major problem of public health in Colombia and the department of Cordoba reports a high number of annual cases of malaria in the country. In order to determine the composition of *Anopheles* species and their participation in malaria transmission in an endemic locality of Cordoba, in this work *Anopheles* mosquitoes were collected in Nuevo Tay. A strategy of PCR-RFLP-ITS2 was used to confirm species assignment by morphological characters; natural infectivity by *Plasmodium* and biting behavior were evaluated. The species detected were *An. nuneztovari* s.l., *An. darlingi*, *An. triannulatus* s.l. and *An. albimanus*, most likely malaria vectors in the locality.

Additional key words: *Anopheles*, Colombia, infectivity, malaria, taxonomy.

Introducción

Los mosquitos del género *Anopheles* son responsables de la transmisión de los parásitos causantes de la malaria en los humanos; enfermedad que continúa siendo uno de

los problemas de salud más importante a nivel mundial (WHO 2015). En Colombia han sido encontradas entre 40 y 47 especies de *Anopheles* (Montoya-Lerma et al. 2011,

González y Carrejo 2007) y se reconocen como vectores primarios de malaria a *Anopheles darlingi* (Root, 1926), *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820) y *Anopheles nuneztovari* s.l. (Gabaldon, 1940), pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus* (Naranjo-Díaz et al. 2013, Gutiérrez et al. 2009, Gutiérrez et al. 2008, Olano et al. 2001). *Anopheles (Anopheles) punctimacula* (Dyar & Knab, 1906), *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* (Theobald, 1901), *Anopheles (Kerteszia) neivai* (Howard, Dyar & Knab, 1912) y *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Zavortink, 1973) son vectores secundarios o de importancia local (Gutiérrez et al. 2008, Quiñones et al. 2006, Olano et al. 2001); también *Anopheles (Anopheles) calderoni* (Wilkerson, 1991) encontrado infectado en el suroeste del país se ha incriminado como vector de malaria (Orjuela et al. 2015). Sin embargo, existen estudios de regiones con altos índices de malaria donde no se encuentran estas especies, por tanto, otras aun no implicadas serían las responsables de la transmisión de la enfermedad (Quiñones et al. 2006).

En áreas endémicas de malaria en Colombia se han realizado investigaciones para detectar posibles vectores anofelinos. En localidades del Urabá-Bajo Cauca y Alto Sinú han encontrado que *An. nuneztovari* s.l. y *An. darlingi* son las especies más abundantes y mantienen el papel de vectores y se encontraron junto con *Anopheles triannulatus* s.l. (Neiva y Pinto, 1922) infectadas naturalmente con *Plasmodium vivax* (Grassi y Feletti, 1890) (Naranjo-Díaz et al. 2013). En zonas del pacífico colombiano se han encontrado infectados con parásitos de la malaria especímenes de *An. nuneztovari* s.l. y se ha señalado por primera vez en la costa pacífica a *An. darlingi* y en Colombia a *An. calderoni* naturalmente infectados (Naranjo-Díaz et al. 2014). En estudios en las regiones Atlántica y Pacífica se ha detectado a *An. albimanus* infectado naturalmente con *P. vivax* VK247 en Nuquí, Chocó y con *P. vivax* VK210

y *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), en Buenaventura, Valle del Cauca y se determinó que la tasa de infectividad para esta región fue de 0,07 %; también se encontró a *An. neivai* infectado con *P. falciparum* en Buenaventura (Gutiérrez et al. 2008). Fueron identificadas las especies de *Anopheles* en siete localidades del noroeste de Colombia con mayor transmisión de malaria y mediante pruebas de ELISA y PCR anidada se detectaba la infectividad natural, encontrando en el departamento de Córdoba a *An. nuneztovari* s.l. y *An. darlingi* infectadas con *P. vivax* VK247 (Gutiérrez et al. 2009). Recientemente, en la localidad de Juan José, Puerto Libertador, departamento de Córdoba, se hallaron infectados especímenes de *An. nuneztovari* s.l., sugiriendo que esta especie tiene un papel importante en la transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum* en esta localidad (Álvarez et al. 2011).

En el departamento de Córdoba se señalan altos números de casos de malaria y el índice parasitario del año 2011 del municipio de Tierralta fue 33,1 (3 002 casos, 90 738 habitantes) constituyendo el alto riesgo de malaria (Gobernación de Córdoba 2011); históricamente, la malaria por *P. vivax* ha predominado en esta región (65 %), seguido por la infección por *P. falciparum* (25 %) y las especies vectores más frecuentes son *An. nuneztovari* s.l., *An. darlingi* y *An. albimanus* (Cucunubá et al. 2013), por tanto es importante realizar estudios sobre la composición actual de las especies de *Anopheles* y su papel en la transmisión en las localidades más endémicas para malaria. Por ello, en este trabajo se buscó determinar las especies presentes y su comportamiento de picadura e infección natural por el parásito, en la localidad endémica para malaria de Nuevo Tay.

Materiales y Métodos

Los mosquitos fueron recolectados en la localidad de Nuevo Tay, municipio de Tierralta, localizado al sur del departamento de Córdoba (lat 08° 10' 34" N, long 76° 03' 46" W), a 51

m, el cual presenta una temperatura media de 27,3 °C, una humedad relativa media de 82 % y una precipitación promedio de 1 144 mm anuales; condiciones que favorecen el desarrollo del vector y del parásito (Alcaldía de Tierralta-Córdoba 2016, Vásquez-Jiménez et al. 2016). Está ubicado en una zona de bosque húmedo tropical según la zonificación de Holdridge, presentando un régimen climático bimodal claramente definido, con una época de lluvia de abril a noviembre y una época seca de diciembre a abril.

Los especímenes se recolectaron entre las 18:00 y las 24:00 horas, en intradomicilio y peridomicilio por tres noches consecutivas cada mes, durante los meses de septiembre y noviembre de 2010 y en mayo, julio y agosto de 2011. Se utilizaron cebos humanos según metodología utilizada por Gutiérrez et al. 2009 y se colectaban individuos adultos en reposo en las paredes de las habitaciones, dentro y fuera de la vivienda, las varetas de corral de ganado y en abrigo animal. La captura con cebo humano de los especímenes adultos, se realizó después de obtener la firma de consentimiento informado de tres participantes y siguiendo el protocolo y procedimiento de captura. A los mosquitos recolectados, se les practicó muerte con vapores de acetato de etilo, se almacenaron individualizados en viales que se empacaron en bolsas plásticas de sello hermético con sílica gel (Castaño et al. 2011). Posteriormente, se tomaron los especímenes en mejor estado de conservación, los cuales fueron identificados con claves taxonómicas (González y Carrejo 2009).

El ADN genómico se obtuvo a partir del abdomen de los mosquitos, utilizando un método de extracción previamente estandarizado (Rosero et al. 2010). Para la amplificación de la región ITS2 se siguió protocolo estandarizado (Cienfuegos et al. 2011, Cienfuegos et al. 2008, Zapata et al. 2007), se usaron iniciadores para las secuencias flanqueantes conservadas de los genes que codifican para las subunidades

5,8S y 28S del RNA ribosomal (Zapata et al. 2007, Beebe and Saul 1995). Para la RFLP, el producto de amplificación fue digerido con la enzima de restricción AluI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU), que reconoce las secuencias 5'-AG▼CT-3'. Los controles para la identificación molecular fueron clones de la región ITS2 de varias especies anofelinas, los cuales cuentan con el respaldo de series e isofamilias.

La detección de mosquitos anofelinos infectados con *Plasmodium*, se determinó por medio del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA (Gutiérrez et al. 2008, Wirtz et al. 1987, 1991).

Resultados y Discusión

En total se recolectaron 239 mosquitos anofelinos. Fueron identificadas por morfología 75 hembras correspondiendo a cinco especies del Subgénero *Nyssorhynchus*: *An. nuneztovari* s.l. (n= 43), *An. triannulatus* s.l. (n= 14), *An. darlingi* (n= 7), *Anopheles oswaldoi* s.l. (Peryassú, 1922) (n= 2), *Anopheles rangeli* (Gabaldon, Cova-Garcia y Lopez, 1940) (n= 1) y varios especímenes que no se pudieron identificar, *Anopheles* sp. (n= 8). La región ITS2 se logró amplificar en el 61,3 % (46/75) de estos especímenes, obteniéndose amplicones que variaron en tamaño entre 470 y 580 pb aproximadamente.

En el 65,2 % de los especímenes procesados por PCR-RFLP-ITS2 la identificación por taxonomía concordó con la confirmación molecular. Esto refleja las limitaciones que se presentan durante la identificación morfológica, entre ellas, la alta variabilidad intra-específica o similitud inter-específica de los especímenes (Gómez et al. 2010) y la presencia de especies hermanas o indistinguibles, como es el caso de los complejos de especies; ello genera dificultades para la diferenciación y determinación de las especies.

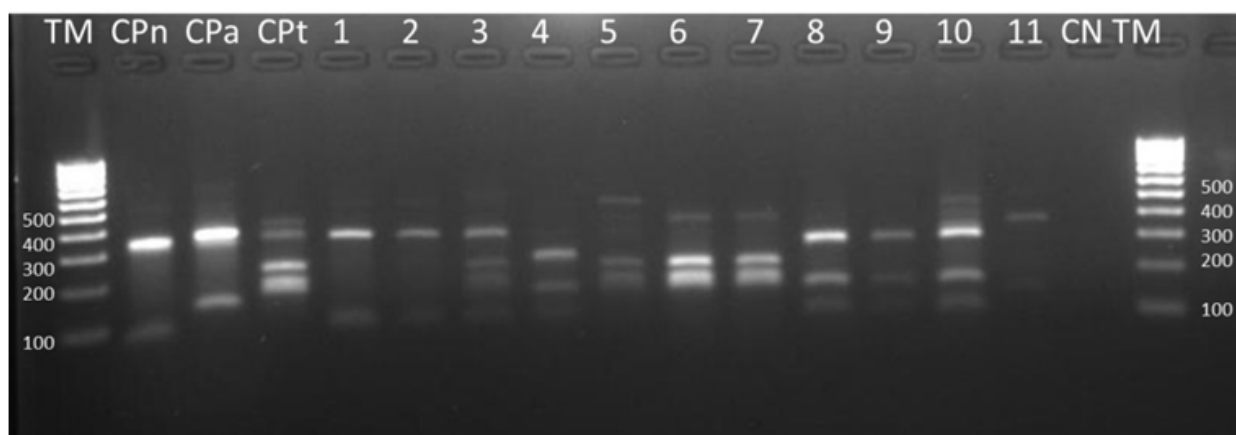


Figura 1. Fragmentos PCR-RFLP-ITS2. Gel de agarosa al 2 %. Pb: pares de bases. Carriles= TM: Marcador de tamaño molecular 100-1000 pb; CPn: Control positivo *An. nuneztovari* s.l.; CPa: Control positivo *An. albimanus*; CPT: Control positivo *An. triannulatus* s.l.; CN: Control negativo; 1,2: Patrones *An. nuneztovari* s.l.; 4: *Anopheles* sp.; 3, 5, 6, 7: *An. triannulatus* s.l.; 8, 9, 10: *An. Darlingi*; 11: *An. albimanus*.

Los productos obtenidos en la RFLP (Figura 1) mostraron patrones de banda esperados para especímenes de *An. nuneztovari* s.l., *An. darlingi* y *An. triannulatus* s.l.; sin embargo, también se obtuvieron patrones correspondientes de *An. albimanus* y un espécimen cuya identificación aún no está definida y se necesita confirmar con una secuenciación. No se encontró el patrón que corresponde de *An. oswaldoi* s.l., por confirmación molecular se determinó que era *An. nuneztovari* s.l. como se ha mencionado previamente para esta especie. Algunos investigadores han informado de la problemática en la identificación por caracteres morfológicos de hembras de los mosquitos del género *Anopheles*, especialmente entre las especies del Grupo Oswaldoi, como es el caso de *An. nuneztovari* s.l., *An. rangeli* y *An. oswaldoi* s.l. (Schiemann et al. 2014, Cienfuegos et al. 2011, Sánchez et al. 2011, Gómez et al. 2010, Cienfuegos et al. 2008, Calle et al. 2008, Zapata et al. 2007, Quiñones et al. 2001).

La especie *An. nuneztovari* s.l. ha sido registrada desde el oeste de Panamá hasta el norte de América del Sur (Faran 1980) y es considerado un vector primario de *Plasmodium* spp. en Colombia y Venezuela (Rubio-Palis 2000). En trabajos realizados previamente en

el departamento de Córdoba, en localidades de los municipios de Montelíbano, Puerto Libertador y Valencia, se ha señalado como la especie más abundante (Schiemann et al. 2014, Sánchez et al. 2011, Parra-Henao y Alarcón 2008). En la localidad de Nuevo Tay, *An. nuneztovari* s.l. correspondió al 47,8 % de los especímenes. Un aspecto que puede estar favoreciendo la presencia de esta especie en esta zona endémica para malaria, es que ella cuenta con las características óptimas para el desarrollo de criaderos de *An. nuneztovari* s.l., propiciados por el gran desarrollo ganadero de la región; esta especie se cría bien en aguas pantanosas, arroyos de agua dulce, ya sea expuestos total o parcialmente al sol, huellas de animales, además de tener preferencia por lugares cercanos a matorrales contiguos a las viviendas (Olano et al. 2001).

Con mayor frecuencia en las tierras bajas cálidas y húmedas a lo largo de su rango de distribución se encuentra *An. darlingi*, registrada desde México hasta el norte argentino (González y Carrejo 2009, Faran y Linthicum 1981). En esta región, *An. darlingi* se ha encontrado en varias localidades del Alto Sinú en los municipios de Valencia, Tierralta, Montelíbano y Puerto

Libertador (Schiemann et al. 2014, Naranjo et al. 2013, Cienfuegos et al. 2011, Sánchez et al. 2011, Gutiérrez et al. 2009). De los ejemplares procesados molecularmente, *An. darlingi* representó el 13,1 %; su presencia en la localidad es debida a las condiciones favorables de altura menor a 500 m, alta humedad, temperaturas entre 21-28 °C y precipitaciones mayores de 1 000 mm anuales, como se ha descrito para esta especie (Montoya-Lerma et al. 2011, Olano et al. 2001).

Por PCR-RFLP-ITS2 se determinaron el 21,73 % de los ejemplares como *An. albimanus*, especie que se encuentra distribuida en la zona costera del país y se halla principalmente a una altitud inferior a 500 m (Olano et al. 2001). En Córdoba se ha documentado su presencia en localidades de Tierralta y en Valencia, donde se encontró como la segunda especie predominante (Gutiérrez et al. 2009), similar al patrón de abundancia determinado en este trabajo, en el cual predomina *An. nuneztovari* s.l. Así mismo, la confirmación molecular permitió determinar que el 15,2 % de los especímenes correspondieron a *An. triannulatus* s.l., que también se ha señalado anteriormente en Córdoba, en las localidades de Montelíbano y Puerto Libertador (Schiemann et al. 2014, Rosero et al. 2012, Gutiérrez et al. 2009).

En este trabajo no se encontraron especímenes infectados naturalmente con los parásitos *P. falciparum* y *P. vivax*, aunque Nuevo Tay es una localidad endémica, con transmisión activa de malaria. A pesar de estos resultados, se resalta el hecho de que en Colombia, tres de las especies detectadas *An. nuneztovari* s.l., *An. albimanus* y *An. darlingi* son vectores importantes y se han detectado infectados naturalmente con *Plasmodium* spp. (Naranjo-Díaz et al. 2013, 2014, Gutiérrez et al. 2008, 2009). En Puerto Libertador se han hallado especímenes de *An. nuneztovari* s.l. con una tasa de infección (IR) del 0.15 % para *P. vivax* VK210 y *P. falciparum* (Álvarez et al. 2011); además, *An. nuneztovari*

s.l. fue encontrado infectado por *P. vivax* VK247 en localidades de Montelíbano representando un IR de 0,489 % y en Tierralta con IR de 0,649 % y también en Puerto Libertador, *An. darlingi* infectado naturalmente por *P. vivax* VK247 con IR de 1.587 % (Gutiérrez et al. 2009). Para *An. albimanus* hay evidencia de la susceptibilidad a la infección por *Plasmodium* en algunas regiones del país (Gutiérrez et al. 2008). Así mismo, *An. triannulatus* s.l. recientemente se ha encontrado infectado por *P. vivax* VK247 (Naranjo-Díaz et al. 2013) y se considera de importancia en la transmisión a nivel local; todo ello sugiere que estas especies pueden estar participando en la transmisión de malaria en la localidad de Nuevo Tay.

Durante las colectas entre las 18-24h, los mosquitos identificados como *An. nuneztovari* s.l. presentaron actividad hematofágica, con mayor actividad entre las 21:00 y 22:00 y principalmente en el intradomicilio; esta especie es un vector reconocido de malaria en Colombia y se ha determinado como una de las especies transmisoras en Tierralta (Gutiérrez et al. 2009); esto y su preferencia endofágica, sugieren un aumento en el riesgo de malaria para los humanos cuando están descansando en su casa entre las 21:00 a 24:00 h (Naranjo-Díaz et al. 2014). Se observó que los especímenes de *An. darlingi* fueron recolectados en mayor abundancia en el intradomicilio y el pico de actividad hematofágica se encontró entre las 20:00 y las 22:00 h. Estudios previos indican un patrón de actividad similar de picadura para esta especie en localidades del noroeste de Colombia (Naranjo-Díaz et al. 2013), lo que sugiere que las actividades de control de vectores pueden ser integradas para la región. *An. albimanus* presentó pico de actividad hematofágica entre las 19:00 a 20:00 en el intradomicilio, lo que coincide con lo señalado previamente para esta especie en Turbo, una localidad de la costa del Caribe de Colombia (Gutiérrez et al. 2009). La mayor parte de los especímenes de *An. triannulatus* s.l.

se capturaron en el extradomicilio, con pico de actividad hematofágica entre las 19:00 a 20:00 h en abrigo animal, que es el hábito predominante que se ha informado para esta especie (Gutiérrez et al. 2008).

Conclusiones

Este trabajo permitió la identificación de especies de *Anopheles* para la localidad de Nuevo Tay y la determinación de su actividad hematofaga. Es notorio la detección de especies que son vectores principales de malaria en nuestro país, tales como *An. nuneztovari* s.l., *An. darlingi*, y *An. albimanus*, además de *An. triannulatus* s.l., considerado vector local en países vecinos. Se sugiere que estas especies mantienen activa la transmisión de la malaria en la localidad. Los resultados de este trabajo aportan información que puede contribuir al mejor desarrollo de los programas de salud pública del departamento de Córdoba.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Oficina de Investigaciones de la Universidad de Córdoba, proyecto con código 1.2.08.102, numeral FCB-01-09 y recibió apoyo del Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, mediante la Estrategia para la Sostenibilidad de Grupos Universidad de Antioquia, Código No. E01719; agradecemos a sus integrantes por su cooperación.

Referencias

- ALCALDÍA DE TIERRALTA-CÓRDOBA. Geografía de Tierralta. [Internet]. Febrero 2016. Disponible en: http://www.tierralta-cordoba.gov.co/informacion_general.shtml#geografia.
- ÁLVAREZ N, ROSERO DA, GÓMEZ GF, CORREA MM. 2011. Detección de mosquitos *Anopheles* infectados naturalmente con *Plasmodium* spp. en Puerto Libertador, Córdoba, Colombia. *Hechos Microbiológicos* 2(2): 27-35.
- BEEBE NW, SAUL A. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction– restriction fragment length polymorphism analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 478–481.
- CALLE DA, QUIÑONES ML, ERAZO HF, JARAMILLO N. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biomédica* 28: 371-385
- CASTAÑO T, SÁNCHEZ P, VIANA L, CORREA M, GUTIÉRREZ L, ZAPATA M. 2011. Comparación de los métodos de preservación de especímenes *Anopheles* (Diptera: Culicidae) para la extracción de ADN. *Salud Uninorte* 27(1): 36-48.
- CIENFUEGOS AV, GÓMEZ GF, CÓRDOBA LA, LUCKHART S, CONN JE, CORREA MM. 2008. 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. *Biomédica* 19: 35-44.
- CIENFUEGOS AV, ROSERO DA, NARANJO N, LUCKHART S, CONN JE, CORREA MM. 2011. Evaluation of a PCR-RFLP-ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. *Acta Tropica* 118: 128–135.
- CUCUNUBÁ ZM, GUERRA AP, RIVERA JA, NICHOLLS RS. 2013. Comparison of asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in two malaria-endemic Colombian locations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 107(2): 129-136.
- FARAN ME. 1980. A revision of the *Albimanus* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). *Contributions of the American Entomological Institute XXXIV* 15: 1-214.
- FARAN ME, LINTHICUM KJ. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* 13: 1-81.
- GOBERNACIÓN DE CÓRDOBA. 2011. Informe Enfermedades Transmitidas por Vectores (Malaria, Dengue, Leishmaniasis). Departamento de Córdoba año 2011. Secretaria de Desarrollo de la Salud Departamento de Córdoba. pp: 2-9.
- GÓMEZ GF, CIENFUEGOS AV, GUTIÉRREZ LA, CONN JE, CORREA MM. 2010. Análisis morfológico y molecular evidencia problemas al identificar *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) por claves dicotómicas. *Revista Colombiana de Entomología* 36(1): 68-75.

- GONZÁLEZ R, CARREJO N. 2007. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Programa Editorial Universidad del Valle. 226 p.
- GUTIÉRREZ LA, NARANJO N, JARAMILLO LM, MUSKUS C, LUCKHART S, CONN JE, CORREA MM. 2008. Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic regions of Colombia. *Acta Tropica* 107: 99-105.
- GUTIÉRREZ LA, GONZÁLEZ JJ, GÓMEZ GF, CASTRO MI, ROSERO DA, LUCKHART S, CONN JE, CORREA MM. 2009. Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Córdoba and Antioquia states in northwestern Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(8): 1117-1124.
- MONTROYA-LERMA J, SOLARTE YA, GIRALDO-CALDERÓN GI, QUIÑONES ML, RUIZ-LOPEZ F, WILKERSON RC. 2011. Malaria vector species in Colombia- A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106(1): 223-238.
- NARANJO-DÍAZ N, ROSERO DA, RUA-URIBE G, LUCKHART S, CORREA MM. 2013. Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasit Vectors* 6: 61.
- NARANJO-DÍAZ N, ALTAMIRANDA M, LUCKHART S, CONN JE, CORREA MM. 2014. Malaria Vectors in Ecologically Heterogeneous Localities of the Colombian Pacific Region. *PLoS ONE* 9(8): e103769.
- OLANO VA, BROCHERO HL, SÁENZ R, QUIÑONES ML, MOLINA JA. 2001. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica* 21: 402-408.
- ORJUELA LI, AHUMADA ML, AVILA I, HERRERA S, BEIER JC, QUIÑONES ML. 2015. Human biting activity, spatial-temporal distribution and malaria vector role of *Anopheles calderoni* in the southwest of Colombia. *Malaria Journal* 14: 256.
- PARRA-HENAO G, ALARCON EP. 2008. Observaciones sobre la bionomía de *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) en el municipio Valencia, departamento Córdoba, Colombia. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* XLVIII(1): 95-98.
- QUIÑONES ML, HARBACH RE, CALLE DA, RUIZ F, ERAZO HF, LINTON YM. 2001. Variante morfológica de adultas hembras de *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomédica* 21: 351-359.
- QUIÑONES ML, RUIZ F, CALLE DA, HARBACH RE, ERAZO HF, LINTON YM. 2006. Incrimination of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *rangeli* and *A. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(6): 617-623.
- ROSEDA DA, GUTIÉRREZ LA, CIENFUEGOS AV, JARAMILLO LM, CORREA MM. 2010. Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología* 36(2): 260-263.
- ROSEDA DA, JARAMILLO LM, GUTIÉRREZ LA, CONN JE, CORREA MM. 2012. Genetic diversity of *Anopheles triannulatus* s.l. (Diptera: Culicidae) from northwestern and southeastern Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87(5): 910-920.
- RUBIO-PALIS Y. 2000. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Maracay: Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental. 120 p.
- SÁNCHEZ J, GALEANO Y, ROSERO DA, NARANJO NJ, CORREA MM. 2011. Confirmación molecular de especie en especímenes *Anopheles* recolectados en el corregimiento de Juan José, Puerto Libertador, Córdoba, Colombia. *Hechos Microbiológicos* 2(1): 19-28.
- SCHIEHMANN DJ, QUIÑONES ML, HANKELN T. 2014. Anthropophilic *Anopheles* species composition and malaria in Tierradentro, Córdoba, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109(3): 384-387.
- VÁSQUEZ-JIMÉNEZ JM, ARÉVALO-HERRERA M, HENAO-GIRALDO J, MOLINA-GÓMEZ K, ARCE-PLATA M, VALLEJO AF, HERRERA S. 2016. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malaria Journal* 15: 70.
- [WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2015. World Malaria Report 2015. [Internet]. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>.
- WIRTZ RA, ZAVALA F, CHAROENVIT Y, CAMPBELL G, BURKOT T, SCHENEIDER I. 1987. Comparative testing of *Plasmodium falciparum* sporozoite monoclonal antibodies for ELISA development. *Bulletin World Health Organization* 65: 39-45.

- WIRTZ RA, CHAROENVIT Y, BURKOT TR, ESSER KM, BEAUDOIN RL, COLLINS WE, ANDRE RG. 1991. Evaluation of monoclonal antibodies against *Plasmodium vivax* sporozoites for ELISA development. *Medical and Veterinary Entomology* 5: 17-22.
- ZAPATA MA, CIENFUEGOS AV, QUIRÓS OI, QUIÑONES ML, LUCKHART S, CORREA MM. 2007. Discrimination of Seven *Anopheles* Species from San Pedro de Urabá, Antioquia Colombia, by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Its Sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77(1): 67-72.