

Taxonomía y sistemática

Distribución y parámetros entomológicos de *Anopheles* (*Anopheles*) *calderoni* (Diptera: Culicidae) de Colombia

Distribution and entomological parameters of Anopheles (Anopheles) calderoni (Diptera: Culicidae) from Colombia

Yadira Galeano-Castañeda ^a, Giovan F. Gómez ^{a, b}, Juan C. Hernández-Valencia ^a
y Margarita M. Correa ^{a, *}

^a Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia

^b Grupo Investigación Ciencias Forenses y de la Salud, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria, calle 78B No. 72A-220, Medellín, Colombia

*Autor para correspondencia: margarita.correa@udea.edu.co (M.M. Correa)

Recibido: 27 marzo 2018; Aceptado: 9 octubre 2018

Resumen

Anopheles calderoni, considerado vector potencial de malaria, fue reportado en la última década en Colombia. Debido a su registro reciente y a la confusión con especies cercanas, se conoce poco sobre su distribución real e importancia epidemiológica. En este trabajo se determinó la distribución y parámetros entomológicos de *A. calderoni* en diversas localidades de Colombia. Se recolectaron especímenes de *Anopheles* en 10 departamentos de varias regiones de Colombia, entre 2009 y 2015. Se caracterizó la región ITS2 para los individuos recolectados y se realizó un análisis bioinformático para predecir su identificación taxonómica mediante una prueba molecular. Se determinó la infección natural por *Plasmodium* y se calcularon parámetros entomológicos. Se registraron especímenes de *A. calderoni* en 4 departamentos del oeste colombiano. La tasa de picadura más alta (14.7 picaduras por noche) se presentó en Tumaco, en el sureste de Colombia, donde se detectó un ejemplar infectado por *Plasmodium falciparum*. El análisis bioinformático produjo patrones de ITS2 que permiten diferenciar a *A. calderoni*. La presencia de esta especie en regiones con características ecológicas diversas, sugiere que tolera diferentes ambientes y su infección con parásitos *Plasmodium*, indica su posible papel como vector de importancia local.

Palabras clave: Malaria; Vectores; ITS2; Infección natural; *Plasmodium*

Abstract

Anopheles calderoni considered a potential malaria vector, was only reported in Colombia during the last decade. Due to its recent report and the confusion with closely related species, little is known about the actual distribution and epidemiological importance of this species. In this work, the distribution and entomological parameters of *A. calderoni* were determined in several localities in Colombia. *Anopheles* specimens were collected in 10 departments from various

regions in Colombia between 2009 and 2015. We characterized the ITS2 region for the collected specimens and performed a bioinformatic analysis to predict its taxonomic identification using a molecular test. We also determined the natural infection by *Plasmodium* and calculated entomological parameters. *A. calderoni* was registered in 4 departments in west Colombia. The highest biting rate (14.7 bites per night) was detected in Tumaco, SW Colombia, where a specimen was found to be infected by *Plasmodium falciparum*. The bioinformatic analysis generated an ITS2 pattern that allows differentiation of this species. The presence of *A. calderoni* in regions with ecological diverse characteristics suggests that this species tolerates varied environments, and its infection with *Plasmodium* parasites indicates its role as a vector of local importance.

Keywords: Malaria; Vectors; ITS2; Natural infection; *Plasmodium*

Introducción

Anopheles calderoni especie perteneciente a la serie Arribalzagia, se encuentra incluida en el grupo Punctimacula, el cual está compuesto por las siguientes especies morfológicamente similares en estado adulto: *Anopheles (Anopheles) punctimacula*, *Anopheles (Anopheles) guarao* y *Anopheles (Anopheles) malefactor* (Rubio-Palis y Moreno, 2003; Wilkerson, 1991). *Anopheles calderoni* se ha registrado en Ecuador (González et al., 2010), Venezuela (Rubio-Palis y Moreno, 2003) y Perú (Calderón et al., 1995; Cruz et al., 2004; Wilkerson, 1991), en este último, se encontró infectada con *Plasmodium vivax* (Kroeger y Alarcón, 1993). En Colombia, *A. calderoni* solo fue registrada en el 2010 (González et al., 2010) debido, en parte, a su errónea identificación taxonómica, ya que anteriormente había sido confundida y reportada como *A. punctimacula*, considerada como un vector de malaria a nivel local (Olano et al., 2001).

La evaluación de especímenes depositados en colecciones, sugiere que *A. calderoni* está presente en por lo menos 10 departamentos de Colombia, e incluso a altitudes mayores a las reportadas anteriormente para esta especie (González et al., 2010). Trabajos posteriores con especímenes recolectados en campo reportan a *A. calderoni* en varias localidades del occidente colombiano (Gómez et al., 2015; Orjuela et al., 2015; Rodríguez-Zabala et al., 2016). Las larvas de *A. calderoni* se detectan tanto en criaderos permanentes como en temporales, en criaderos artificiales de uso doméstico, en excavaciones, lagunas, estanques de peces, zanjas, arroyos y cultivos de palma (Conde et al., 2015; Naranjo-Díaz et al., 2014; Orjuela et al., 2015). Por ello, se supone que podría tener una distribución más amplia de la conocida actualmente.

Algunos estudios de comportamiento, en localidades del Departamento del Valle del Cauca, Colombia, muestran que *A. calderoni* presenta gran heterogeneidad en su actividad de picadura al humano (Lucumi et al., 2011). Esta especie se encontró naturalmente infectada por *P. falciparum* en localidades del municipio de Tumaco (Naranjo-Díaz et al., 2014) y en Boca Prieta con *P. vivax*

VK210 y *P. falciparum* (Orjuela et al., 2015), ubicadas en el Departamento de Nariño, al sur occidente del país. En dicho estudio, *A. calderoni* fue la especie predominante (> 90%) en las localidades de municipios que reportaron índices parasitarios anuales -IPA (número de casos de malaria por cada mil habitantes de población en riesgo) de 29 y 59 (Orjuela et al., 2015). Por lo tanto, se ha sugerido que *A. calderoni* podría ser un vector de importancia local.

Los trabajos previos en Colombia han utilizado secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI; Gómez et al., 2015; González et al., 2010; Orjuela et al., 2015) y el gen nuclear espaciador interno transcrito 2 (ITS2; Gómez et al., 2015) para la acertada identificación de las especies de la serie Arribalzagia. Aunque estos marcadores han sido de gran utilidad, es necesario la implementación de una técnica molecular sencilla y económica como la PCR-RFLP, que puede llevarse a cabo en el laboratorio para la correcta diferenciación de estas especies.

En el presente trabajo se analizaron especímenes de *Anopheles* recolectados en localidades ubicadas en 10 departamentos de Colombia con el fin de conocer la distribución actual de *A. calderoni* en regiones ecológicamente diversas del país. Además, se calcularon las tasas de picadura y de inoculación entomológica, y se determinó la infección natural por *Plasmodium* para lograr una aproximación a su importancia epidemiológica en las regiones donde se encuentra presente en Colombia. Además, se caracterizó la región ITS2 y se realizó un análisis bioinformático para el diseño de una prueba molecular que permita su diferenciación de las otras especies de la serie Arribalzagia presentes en Colombia.

Materiales y métodos

Los mosquitos *Anopheles* incluidos en este estudio fueron recolectados utilizando atrayente humano protegido. Se utilizó un protocolo y consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad Nacional de Salud Pública de la Universidad de Antioquia, Acta número 063. Las recolectas se hicieron durante 3 noches consecutivas en 2 puntos por localidad, entre las 18:00 y 24:00 hr,

en intra y peridomicilio. Los ejemplares se recolectaron en localidades de los siguientes 10 departamentos de Colombia: Antioquia, Chocó, Valle del Cauca, Norte de Santander, Córdoba, La Guajira, Magdalena, Amazonas, Risaralda y Nariño; entre los años 2009 y 2015 (tabla 1, fig. 1A). Para obtener una distribución más completa de *A. calderoni*, se incluyen especímenes de trabajos previos del grupo (tabla 2). Las coordenadas de las localidades donde se encontró *A. calderoni* se posicionaron sobre el mapa de ecorregiones de la WWF (Olson et al., 2001), utilizando el Software ArcGIS 10.2 (ESRI, 2014).

Los organismos fueron identificados usando la clave morfológica de González y Carrejo (2009) y se confirmó la identidad de la especie por análisis de secuencias ITS2 y COI. Las secuencias de ITS2 se compararon con las reportadas para esta especie en GenBank y las de 5'COI en la base de datos Barcode of Life Data System -BOLD,

lo que corroboró que los ejemplares analizados pertenecen realmente a *A. calderoni*.

Los ejemplares de *A. calderoni* fueron evaluados para determinar su infección natural por parásitos de *Plasmodium* spp. utilizando un ensayo inmunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- ELISA). Se analizaron mezclas de las cabezas y el tórax de hasta 5 mosquitos de *A. calderoni* de la misma localidad, usando anticuerpos monoclonales dirigidos a *P. falciparum*, *P. vivax* VK247 y *P. vivax* VK210, en platos separados (Gutiérrez et al., 2008). Los mosquitos positivos se confirmaron por una segunda ELISA y posteriormente se realizó una PCR anidada con cebadores específicos para el género *Plasmodium* (Gutiérrez et al., 2008, Singh et al., 1999).

La tasa de picadura a humanos (TPH), que indica el promedio de picaduras de *A. calderoni* que recibe una persona en 1 noche, se calculó por periodo de captura

Tabla 1
 Especies de *Anopheles* encontradas cohabitando con *Anopheles calderoni*.

Departamento	Municipio	Especie	n	Total
Nariño	Tumaco	<i>A. albimanus</i>	495	1,078
		<i>A. punctimacula</i>	2	
		<i>A. calderoni</i>	581	
	Francisco Pizarro	<i>A. albimanus</i>	121	179
		<i>A. calderoni</i>	58	
Risaralda	Pereira	<i>A. albimanus</i>	114	153
		<i>A. triannulatus</i>	12	
		<i>A. neomaculipalpus</i>	1	
		<i>A. calderoni</i>	26	
Valle del Cauca	Cartago	<i>A. calderoni</i>	17	17
		Riofrio	<i>A. albimanus</i>	3
	Buga	<i>A. calderoni</i>	48	111
		<i>A. triannulatus</i>	32	
	Dagua	<i>A. calderoni</i>	79	1
			<i>A. calderoni</i>	
Chocó	Atrato	<i>A. apicimacula</i>	3	242
		<i>A. nuneztovari</i>	86	
		<i>A. darlingi</i>	152	
	Istmina	<i>A. calderoni</i>	1	562
		<i>A. darlingi</i>	271	
		<i>A. nuneztovari</i>	288	
		<i>A. malefactor</i>	1	
		<i>A. punctimacula</i>	1	
		<i>A. calderoni</i>	1	

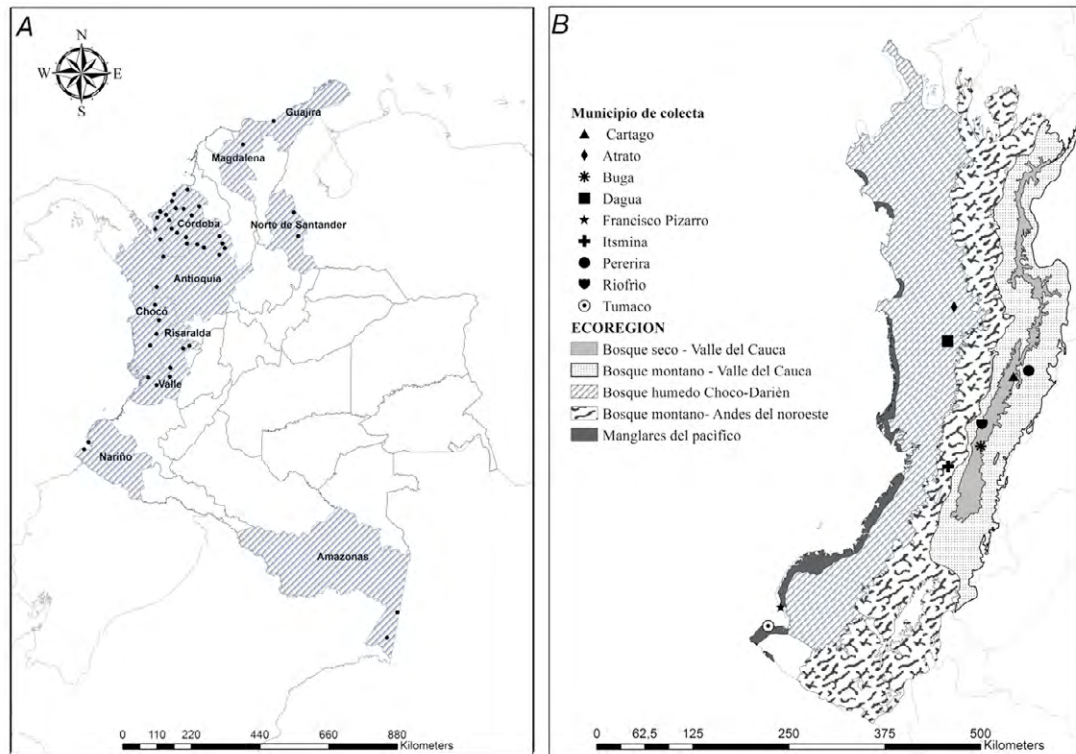


Figura 1. A, Sitios de colecta de especímenes *Anopheles*; B, ecorregiones y localidades donde se encontró *Anopheles calderoni*.

tomando el total de mosquitos (nt) sobre el número de noches de capturas (nc) y el promedio de cebos humanos (xch) utilizados [TPH = $nt/nc/xch$]. La tasa de infección (TI) se expresó como el número de mosquitos infectados por parásitos *Plasmodium* (ni), sobre el número total de mosquitos (nt) capturados a nivel de municipio [TI = $(ni/nt) \times 100$]. Los intervalos de confianza (IC, 95%) se calcularon bajo el supuesto de una distribución binomial utilizando el software EPIDAT, versión 3.1 (Hervada et al., 2004). La tasa de inoculación entomológica (TIE), que indica el número de picaduras infectivas que puede recibir una persona en el transcurso de 1 año, se calculó por municipio tomando el promedio de TPH multiplicada por 365 días y la tasa de infección [TIE = $TPH \times 365 \times TI$] (Gutiérrez et al., 2008; Naranjo-Díaz et al., 2013; Rosero et al., 2013).

Para confirmar molecularmente a los mosquitos identificados por morfología como *A. calderoni*, se extrajo ADN a partir del abdomen (Rosero et al., 2010). Se amplificó la región ITS2 siguiendo las condiciones previamente estandarizadas (Cienfuegos et al., 2008, 2011; Zapata et al., 2007). Adicionalmente, se amplificó y secuenció el fragmento 5'COI o región código de barras (González et al., 2010) en especímenes representativos de

cada localidad para confirmar la asignación de especie dada por la región ITS2.

Con el fin de buscar estrategias para la diferenciación de *A. calderoni* de otras especies de la serie Arribalzagia, se caracterizó la región ITS2 en mosquitos de esta especie para el diseño de una prueba basada en una PCR-RFLP. Se analizó la secuencia ITS2 en organismos de varias localidades: Buga ($n = 3$), Riofrío ($n = 3$) y Cartago ($n = 1$) en el Departamento del Valle del Cauca; Pereira ($n = 3$) en el Departamento Risaralda y Tumaco ($n = 5$) en el Departamento Nariño. Se clonó, secuenció y analizó la ITS2 de estos especímenes. Las secuencias se editaron y anotaron en Geneious 6.0 (Kearse et al., 2008), y subsecuentemente se alinearon y compararon con las secuencias reportadas para *A. calderoni* de Colombia, HQ622618 y HQ622619 (González et al., 2010). Posteriormente, se determinó la variabilidad inter e intraespecimen. Finalmente, se realizó un análisis bioinformático, una restricción “in silico” de las secuencias ITS2, utilizando el programa NEBcutter V 2.0 (Vincze et al., 2003). Se usaron las enzimas disponibles en la plataforma para obtener información preliminar y determinar si *A. calderoni* producía patrones de restricción que permitieran diferenciarlo de otras especies de *Anopheles*.

Tabla 2
 Localidades de procedencia de los especímenes analizados.

Departamento	Municipio	Localidad	Longitud (O)	Latitud (N)	Referencia
Valle del Cauca	Buga	Laguna de Sonso	76° 20'52.799"	3° 52'33.6"	Gómez et al., 2015
Valle del Cauca	Riofrío	El Jagual	76° 17'16.453"	4° 9'52.286"	Gómez et al., 2015
Valle del Cauca	Cartago	Hacienda Limones	75° 55'10.8"	4° 42'54.4"	Gómez et al., 2015
Valle del Cauca	Dagua	Ricaurte	76° 41'6.299"	3° 39'38.9"	ET
Risaralda	Pereira	La Carbonera	75° 44'19.799"	4° 46'58.6"	Gómez et al., 2015
Nariño	Tumaco	Pindales	78° 46'14.599"	1° 48'24.9"	Naranjo-Díaz et al., 2014
Nariño	Francisco Pizarro	La Playa - Salahondita	78° 38'39.599"	2° 0'42.6"	ET
Chocó	Istmina	San Antonio	76° 41'24.799"	5° 7'49.2"	ET
Chocó	Atrato	Arenal - Doña Josefa	76° 36'53.3"	5° 31'43.8"	ET
Antioquia	Bagre	La Capilla	74° 42'56.3"	7° 35'43.699"	Gómez et al., 2015
Antioquia	San Pedro de Urabá	El Caño	76° 19'7.604"	8° 24'19.487"	Gómez et al., 2015
Antioquia	Turbo	Yarumal	76° 43'42.3"	8° 9'3.7"	Gómez et al., 2015
Antioquia	Vigía del Fuerte	San Antonio de Padua	76° 40'35.662"	6° 29'15.572"	Naranjo-Díaz et al., 2014
Antioquia	Zaragoza	El Retiro	74° 52'21.6"	7° 24'51.3"	Gómez et al., 2015
Norte de Santander	Tibú	Caño Victoria	72° 39'24.765"	8° 33'26.125"	Gómez et al., 2015
Norte de Santander	Zulia	Santa Rosa	72° 33'21.393"	8° 15'53.409"	Gómez et al., 2015
La Guajira	Dibulla	Dibulla rural	73° 17'59.999"	11° 16'1.2"	Gómez et al., 2015
Magdalena	Los Achiotos	Los Achiotos	73° 35'59.999"	11° 15'0"	Gómez et al., 2015
Amazonas	Leticia	Km 6 - Km 11	69° 55'58.8"	S 4° 12'54"	Gómez et al., 2015
Amazonas	Tarapacá	Nueva Unión	69° 45'28.799"	S 2° 53'45.6"	Gómez et al., 2015
Antioquia	Necoclí	Pueblo Nuevo - Bellavista	76° 47'2.4"	8° 25'33.6"	Gómez et al., 2015
Antioquia	Arboletes	La Arenosa	76° 26'8.226"	8° 33'36.208"	ET
Córdoba	Montería	Sierra Chiquita	75° 55'41.474"	8° 43'23.651"	ET
Antioquia	San Carlos	Guacharacal	75° 40'8.799"	8° 33'13.5"	ET
Córdoba	Valencia	Santa Fe de Pirú	76° 14'49.199"	8° 9'29.902"	ET
Antioquia	Nechí	Puerto Astilla	74° 51'36.551"	7° 57'16.262"	ET
Córdoba	Moñitos	Río Cedro	76° 5'59.999"	9° 15'0"	Gómez et al., 2015
Córdoba	San Antero	Bahía Cispatá	75° 47'28.2"	9° 17'37.702"	ET
Antioquia	Mutatá	La Secreta	76° 28'51.527"	7° 20'53.397"	ET
Antioquia	Apartado	La Victoria - Salsipuedes	76° 34'34.799"	7° 51'49.5"	ET
Antioquia	Caucasia	Cuturú - Puerto Triana	74° 48'0.258"	7° 44'39.594"	ET

Tabla 2
Continuación

Departamento	Municipio	Localidad	Longitud (O)	Latitud (N)	Referencia
Antioquia	Cáceres	Asturias - Campanario	75° 19'20.3"	7° 37'12.3"	ET
Córdoba	Montelibano	Puerto Anchica -Puerto Nuevo	75° 49'58.599"	7° 55'1.099"	Gómez et al., 2015
Córdoba	Puerto libertador	Juan José	75° 48'43.873"	7° 43'50.606"	Gómez et al., 2015
Córdoba	Tierralta	Tuis Tuis	76° 5'57.138"	8° 3'16.094"	ET
Córdoba	Canalete	El Limón - Buenos Aires de las Pavas	76° 13'31.972"	8° 46'45.21"	ET
Antioquia	San Juan de Urabá	La Mugrosa	76° 34'54.9"	8° 39'57.174"	ET
Antioquia	Taraza	Santa Clara - El Rayo	75° 24'3.191"	7° 35'35.735"	ET
Chocó	Medio Atrato	Puné - Tauchigado	76° 44'18.499"	5° 57'59.172"	ET
Valle del Cauca	Buenaventura	Zacarías - Córdoba	76° 55'35.806"	3° 52'6.114"	Naranjo-Díaz et al., 2014
Chocó	Medio San Juan	Paimadó - San Miguel	76° 51'48.389"	4° 48'15.523"	ET
Córdoba	Sahagun	Trementino	75° 27'35.499"	8° 48'41.4"	ET
Córdoba	Puerto Escondido	EL Palmar	76° 14'17"	8° 57'25.7"	ET

Referencia: especímenes de trabajos previos del grupo; ET: especímenes específicos de este trabajo.

Resultados

En algunas localidades donde se detectó *A. calderoni* pueden encontrarse cohabitando otras especies del género *Anopheles*. Sin embargo, se observa que dependiendo de la localidad, departamento y ecorregión, las especies con las que cohabita varían (tabla 1, fig. 1B). En las localidades del Departamento de Nariño, *A. calderoni* es la especie dominante o la segunda en abundancia después de *A. albimanus*. Igualmente, en 2 de las localidades del Valle del Cauca (Buga y Riofrio), fue la especie más abundante durante el muestreo y en las otras 2 (Cartago y Dagua), solo se detectó *A. calderoni*, aunque poco abundante. En las localidades del Departamento de Chocó, se observa una mayor riqueza de especies; en éstas, *A. calderoni* se encuentra en bajo número, mientras que *A. nuneztovari* y *A. darlingi*, que son los vectores primarios de Colombia, son las que se registraron con mayor abundancia. En las localidades de los departamentos de Antioquia, Norte de Santander, Magdalena y Amazonas no se encontraron especímenes de *A. calderoni*, pero se detectaron otras de las especies de la serie Arribalzagia, incluyendo a: *A. malefactor*, *A. neomaculipalpus*, *A. punctimacula*, *A. matogrosensis* y *A. peryasuii*.

De los 683 ejemplares de *A. calderoni* evaluados, solo se detectó 1 infectado con *P. falciparum*, recolectado en el municipio de Tumaco (11) (tabla 3). La tasa de infección para el período fue de 0.17 %. La tasa de picadura en humanos más alta, de 14.7 picaduras por persona por noche, se registró en el municipio de Tumaco para el mismo período en que fue capturado el mosquito infectado con *P. falciparum*. Se estimó que una persona puede recibir 3.1 picaduras de *A. calderoni* infectivas al año (tabla 3).

Se obtuvieron 38 secuencias ITS2 de *A. calderoni*, las cuales tuvieron un 99.6% de similitud con las reportadas para Colombia en GenBank (González et al., 2010). Las secuencias tuvieron una longitud de 357 pb. La composición nucleotídica promedio fue de 53.5% GC. Se encontraron 21 sustituciones nucleotídicas que constituyeron 20 sitios polimórficos y 13 variantes, lo que representa una baja variabilidad intragenómica (tabla 4). No se encontraron inserciones o deleciones. Los análisis bioinformáticos mostraron que la enzima *AluI*, frecuentemente utilizada para confirmación molecular de varias especies de *Anopheles* (Cienfuegos et al., 2008, 2011), no genera cortes en la secuencia ITS2 de esta especie. Sin embargo, se encontraron otras enzimas de restricción que producen patrones distinguibles que representan la región ITS2 de *A. calderoni*, como es la enzima *HaeIII*; ésta reconoce un sitio en la secuencia y genera un patrón de 2 bandas de 220 pb y 181 pb (fig. 2).

Tabla 3

Infección natural por *Plasmodium* y parámetros entomológicos registrados para *Anopheles calderoni*.

Departamento	Municipio	Núm. días/CH	Año/mes de captura	n	TPH	TI (IC)	TIE anual
Nariño	Tumaco	5/4	2009 junio	3	0.1	0.17% (0.03-0.95) <i>P. falciparum</i> ^a	3.1
	Tumaco	6/4	2009 octubre	42	1.7		
	Tumaco	6/4.3	2010 enero	90	3.5		
	Tumaco	6/4.5	2010 abril	400	14.7		
	Tumaco	6/4	2015 agosto	56	2.3		
	Francisco Pizarro	6/4	2015 agosto	58	2.4		
Risaralda	Pereira	4/2	2012 febrero	26	3.3		
Valle del Cauca	Cartago	4/2	2012 febrero	17	2.1		
	Riofrío	3/2	2012 febrero y marzo	48	8		
	Buga	4/2	2012 marzo	79	9.8		
	Dagua	6/4.3	2015 mayo	1	0.04		
Chocó	Atrato	6/4.5	2015 marzo	1	0.04		
	Istmina	6/4	2015 noviembre	1	0.04		

CH: Cebo humano (promedio); n: número de *A. calderoni* evaluados por infección natural; TPH: tasa de picadura en humanos por periodo de captura; TI: tasa de infección en Tumaco; IC: intervalo de confianza de la TI; ^a: ejemplar positivo para *P. falciparum* por ELISA y PCR anidada; TIE: tasa de inoculación entomológica anual para Tumaco.

Tabla 4

Caracterización de la región ITS2 en especímenes *A. calderoni*.

Código de los especímenes	ITS2	% GC	Transición	Transversión
BUG13	357 pb	53.5	N/A	N/A
BUG476	357 pb	53.8	A/G (95)	N/A
BUG467	357 pb	53.5	T/C (171)	N/A
CAR7	357 pb	53.4	N/A	T/G (266)
PER24	357 pb	53.7	G/A (39), T/C (71), G/A (77), G/A (99), T/C (169), G/A (202), G/A (336)	T/A (68), A/T (170), A/T (171), A/T (315), G/T (335)
PER36	357 pb	53.7	A/G (317)	N/A
PER66	357 pb	53.5	N/A	N/A
RIO5	357 pb	53.5	N/A	G/T (266), A/T(297)
RIO8	357 pb	53.3	C/T (99)	T/G (266)
RIO21	357 pb	53.2	N/A	N/A
T1807	357 pb	53.5	N/A	N/A
T1815	357 pb	53.5	N/A	N/A
T1973	357 pb	53.5	N/A	N/A
T1965	357 pb	53.4	N/A	C/A (3)
T2305	357 pb	53.5	N/A	N/A

BUG: Buga, RIO: Riofrío, CAR: Cartago, PER: Pereira, T: Tumaco.

% GC: porcentaje de guanina y citosina.

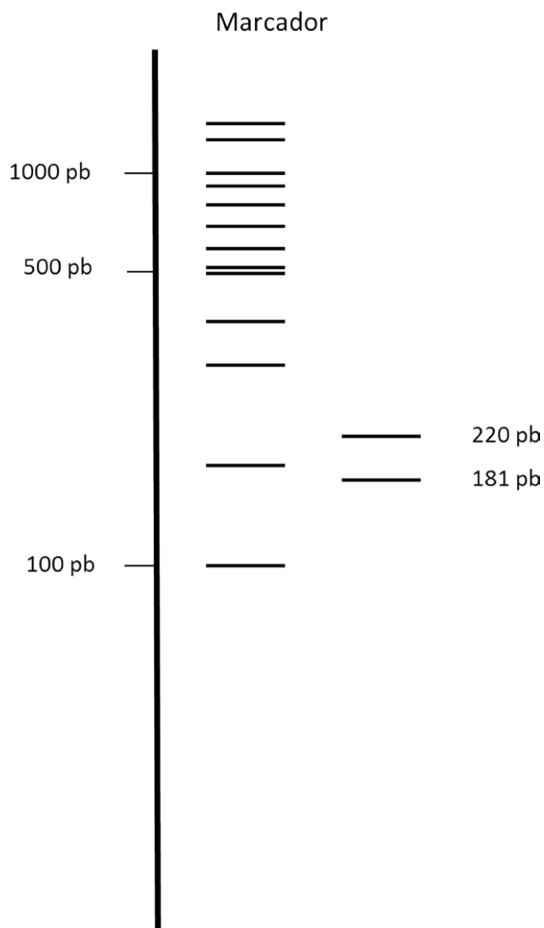


Figura 2. Restricción “in silico” que representa los patrones de la región ITS2 de *A. calderoni* digerida con la enzima *Hae*III. Se produce un patrón de 2 fragmentos: 220 y 181 pb. Marcador: representa el marcador de peso molecular.

Discusión

Este estudio provee información sobre la distribución reciente de *A. calderoni* en localidades de varios departamentos de Colombia, las cuales comprenden diversas ecorregiones. De los 10 departamentos muestreados, solo se detectó *A. calderoni* en 4, todos ellos ubicados al occidente del país. Chocó, Valle del Cauca, Risaralda y Nariño, que comprenden las ecorregiones de Manglares del Pacífico, Bosque montano, Bosque seco y Bosque húmedo (Encyclopedia of Earth, 2016). La presencia de *A. calderoni* en estas ecorregiones puede sugerir su capacidad de establecerse en condiciones ambientales heterogéneas.

Los resultados demuestran que *A. calderoni* está distribuida al occidente del país. No se detectó la especie en localidades al norte, noreste y sur de Colombia. Además, se encontró en mayor abundancia en la municipalidad de

Tumaco, Nariño, al sur la Costa Pacífica, que corresponde a la ecorregión de Manglares del Pacífico. Un estudio anterior (Orjuela et al., 2015) indicó que las variables ambientales de precipitación y la humedad relativa explican la abundancia de la especie, sugiriendo estacionalidad en cuanto la presencia de *A. calderoni* (Orjuela et al., 2015), con mayor abundancia en temporada lluviosa (Naranjo-Díaz et al., 2014).

En la colección del Museo de Entomología de la Universidad del Valle (MUSENUV), se encuentran depositados especímenes de *A. calderoni* de las costas atlántica y pacífica de Colombia, e incluso del interior del país, como es del Departamento del Tolima (González et al., 2010), comprendiendo regiones con características ecológicas de bosque seco Valle del Cauca, bosque húmedo Magdalena-Urabá, la barrera desértica del Caribe y bosque montano Valle del Cauca. A diferencia de dicho estudio, en el presente trabajo, *A. calderoni* no se detectó en los muestreos llevados a cabo en los departamentos del norte, noreste, noroeste y sureste de Colombia. Esto puede tener varias explicaciones, como la diferencia temporal entre los muestreos de ambos trabajos, o la época del año en que se realizaron las recolectas, sobre todo si se considera la hipótesis de que *A. calderoni* es influenciada por la estacionalidad (Orjuela et al., 2015). En este estudio se corrobora la presencia de *A. calderoni* en varias localidades de la región pacífica. Además, se presenta un nuevo registro para la localidad Ricaurte, municipio de Dagua, en el Departamento del Valle del Cauca.

Es de notar que, aunque *A. calderoni* no se encontró en las localidades de los Departamentos de Antioquia, Norte de Santander, Magdalena y Amazonas, en éstos fueron encontradas otras especies de la serie Arribalzagia como *A. malefactor*, *A. neomaculipalpus*, *A. punctimacula*, *A. mattogrosensis* y *A. peryasuii*, las cuales pueden presentar problemas durante la identificación por morfología y confundirse con *A. calderoni* (Gómez et al., 2015). Por ello se realizó la caracterización de la región ITS2 en *A. calderoni* como una aproximación inicial, para buscar una estrategia que permita su diferenciación con las demás especies de la serie Arribalzagia. La región ITS2 ha sido previamente utilizada en una prueba molecular basada en una PCR-RFLP para diferenciar especies de *Anopheles* (Cienfuegos et al., 2008, 2011; Zapata et al., 2007). Esta prueba es relativamente sencilla de realizar en el laboratorio y tiene un costo moderado comparado con la secuenciación de ADN. La caracterización de la ITS2 en *A. calderoni* y la realización de un análisis de restricción “in silico” indicaron que la enzima *Hae*III genera cortes en la región ITS2 de *A. calderoni* que producen patrones que permitirían diferenciar la especie. Se recomienda que en trabajos futuros se caracterice ITS2 para las demás

especies de la serie presentes en Colombia para determinar los patrones de ITS2 de cada una de ellas, y así establecer una metodología que permita la diferenciación efectiva de especímenes recolectados en campo.

Adicionalmente, se encontró una baja variabilidad en la ITS2 en los insectos de *A. calderoni*. La conservación de la región ITS2, se ha atribuido al proceso de evolución concertada que homogeniza las diferentes copias de la ITS2 entre los ejemplares de una misma especie (Li y Wilkerson, 2007). La baja variabilidad en la región ITS2 de *A. calderoni* indica su utilidad como marcador en una prueba de identificación molecular de estas especies.

El análisis de la tasa de picadura y la estimación de la tasa de inoculación entomológica revelaron una alta preferencia de picadura al humano por parte de *A. calderoni*. Se estimó que una persona puede recibir 3.1 picaduras infectivas al año. Por su comportamiento antropofílico y el hallazgo de su infección natural por el parásito, se considera que *A. calderoni* es un vector potencial de malaria a nivel local, específicamente en el sureste del país (Conde et al., 2015; Naranjo-Díaz et al., 2014). Aunque la tasa de infección para *A. calderoni* reportada en este estudio es de 0.17%, es menor que la reportada para Perú (0.26%) (Cruz et al., 2004), pero es mayor a las reportadas para vectores primarios como *A. nuneztovari* (0.101%) y *A. darlingi* (0.087%) (Naranjo-Díaz et al., 2013). La tasa de picadura en humanos para *A. calderoni* varió entre las localidades (0.04 - 14.7 picaduras por noche), y la mayor tasa se registró para Tumaco en Nariño (14.7 picaduras por noche). Aunque esta tasa es considerada alta, se han reportado tasas de picadura aún más altas en el Departamento del Valle del Cauca (55.7 - 65.8 picaduras por noche) (Lucumi et al., 2011). Por ello, en caso de tratarse de un vector local, la presencia de *A. calderoni* supondría un alto riesgo de transmisión de la malaria. Por todo ello, se recomienda realizar estudios futuros que brinden información sobre la biología e importancia epidemiológica de *A. calderoni* con el fin de implementar intervenciones de control vectorial dirigidas.

Agradecimientos

Este trabajo se derivó de un proyecto financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), código Núm. 596-2013 y recibió apoyo de la Estrategia para la Sostenibilidad de Grupos de Investigación, Universidad de Antioquia-UdeA 2016-2017, código Núm. ES84160123 y proyecto Programática de la Universidad de Antioquia, código Núm. 2015-7543. YGC es becaria de Colciencias. JCH estuvo bajo una beca de pasantía de Joven Investigador CODI-UdeA.

Referencias

- Calderón, G., Fernández, R. y Valle, J. (1995). Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*, 8, 5–23.
- Cienfuegos, A., Gómez, G., Córdoba, L., Luckhart, S., Conn, J. y Correa, M. (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. *Revista Biomedica (Mex)*, 19, 35–44.
- Cienfuegos, A., Rosero, D., Naranjo, N., Luckhart, S., Conn, J. y Correa, M. (2011). Evaluation of a PCR-RFLP-ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. *Acta Tropica*, 118, 128–135.
- Cruz, G., Valle, T. y Ruiz, M. (2004). Determinación de los hábitos de *A. pseudopunctipennis* y *A. calderoni* en dos localidades del valle de Chao. La Libertad, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 21, 223–30.
- Conde, M., Pareja, P., Orjuela, L., Ahumada, M., Durán, S., Jara, J. et al. (2015). Larval habitat characteristics of the main malaria vectors in the most endemic regions of Colombia: potential implications for larval control. *Malaria Journal*, 14, 476.
- Encyclopedia of Earth. (2016). Recuperado 4 May 2016 de: <https://eearthlive.wordpress.com/view/article/51cbf3e67896bb431f6ae6a8/>
- ESRI. (2014). ArcGIS Desktop: Release 10.2 Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.
- Gómez, G. F., Bickersmith, S. A., González, R., Conn, J. E. y Correa, M. M. (2015). Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the Neotropical Arribalzagia. *Plos One*, 10, e0119488.
- González, R. y Carrejo, N. (2009). *Introducción al estudio taxonómico de Anopheles de Colombia: claves y notas de distribución*. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle.
- González, R., Carrejo, N., Wilkerson, R. C., Alarcón, J., Alarcón-Ormasa, J., Ruiz, F. et al. (2010). Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Cruz*, 105, 1001–1009.
- Gutiérrez, L., Naranjo, N., Jaramillo, L., Muskus, C., Luckhart, S., Conn, J. et al. (2008). Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*, 107, 99–105.
- Hervada, V., Santiago, P., Vázquez, F. Castillo, S., Loyola, E. y Silva, A. (2004). Epidat 3.0 programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. *Revista Española de Salud Pública*, 78, 277–80.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. et al. (2008). Geneious basic: an integrated and

- extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–9.
- Kroeger, A. y Alarcón, J. (1993). *Malaria en Ecuador y Perú y estrategias alternativas de control*. Quito: Abya-Yala.
- Li, C. y Wilkerson, R. (2007). Intragenomic rDNA ITS2 variation in the neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Heredity*, 98, 51–9.
- Lucumi, A., González, R. y Salas, Q. (2011). Actividad de picadura de *Anopheles calderoni* (Diptera: Culicidae) en dos localidades de Valle del Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 37, 256–261.
- Naranjo-Díaz, N., Rosero, D., Rua, G., Luckhart, S. y Correa, M. (2013). Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasites & Vectors*, 6, 61.
- Naranjo-Díaz, N., Altamiranda, M., Luckhart, S., Conn, J. E. y Correa, M. (2014). Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. *Plos One*, 9, e103769.
- Olano, V., Brochero, H., Sáenz, R., Quiñones y M. Molina, J. (2001). Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Revista Biomedica*, 21, 402–408.
- Olson, D., Dinerstein, E., Wikramanayake, E., Burgess, N., Powell, G., Underwood, E. et al. (2001). Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on earth. *BioScience*, 51, 933–938.
- Orjuela, L., Ahumada, M., Ávila, I., Herrera, S., Beier, J. y Quiñones, M. (2015). Human biting activity, spatial-temporal distribution and malaria vector role of *Anopheles calderoni* in the southwest of Colombia. *Malaria Journal*, 14, 256.
- Rodríguez-Zabala, J., González, R., Correa, M. M. y Gómez, G. (2016). Análisis morfométrico de dos poblaciones de *Anopheles (Anopheles) calderoni* (Diptera: Culicidae) del suroccidente colombiano. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 966–971.
- Rosero, D., Naranjo-Díaz, N., Álvarez, N., Cienfuegos, A. V., Torres, C., Luckhart, S. et al. (2013). Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) naturally infected with *Plasmodium* spp. *ISRN Parasitology*, 2013, 927453.
- Rosero, D., Gutiérrez, L., Cienfuegos, A., Jaramillo, L. y Correa, M. (2010). Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología*, 36, 260–263.
- Rubio-Palis, Y. y Moreno, J. (2003). Primer registro de *Anopheles (Anopheles) calderoni* (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Entomotropica*, 18, 159–161.
- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M. y Rahman, H. (1999). A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 687–682.
- Vincze, T., Posfai, J. y Roberts, R. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31, 3688–91.
- Wilkerson, R. (1991). *Anopheles (Anopheles) calderoni* n. sp., a malaria vector of the Arribalzagia series from Peru (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 23, 25–37.
- Zapata, M., Cienfuegos, A., Quirós, O., Quiñones, M., Luckhart, S. y Correa, M. (2007). Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of ITS2 sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 67–72.