

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, Suplemento No. 2 - Entomología médica - Octubre de 2017
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

Portada: *Culex quinquefasciatus*, adultos hembra en una planta de jardín, Bogotá
Nikon D7000, lente macro de 105 mm

Raúl Pardo, Grupo de Entomología, Dirección de Investigación en Salud Pública,
Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, Suplemento No. 2, Entomología médica - Bogotá, D.C., Colombia - Octubre de 2017

Editores Invitados

Raúl Pardo
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Orlando Torres-Fernández
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Jorge Alberto Molina
Universidad de los Andes,
Bogotá, D.C., Colombia

Comité Editorial

Editores

Luis Alberto Gómez
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Carlos Arturo Hernández
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Rubén Santiago Nicholls
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Editores Asociados

Enrique Ardila
Bogotá, D.C., Colombia

José de Jesús Moreno-Montoya
Universidad El Bosque
Bogotá, D.C., Colombia

Julián Alfredo Fernández-Niño
Universidad del Norte
Barranquilla, Colombia

Miguel A. Guzmán
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Leonard Munstermann
Yale University School of Medicine
New Haven, CT, Estados Unidos

Omar Segura
Federación Médica Colombiana
Bogotá, D.C., Colombia

Orlando Torres-Fernández
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Raúl Pardo
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Comité Científico

Arnoldo Barbosa
Universidad del Tolima
Ibagué, Colombia

Antonio Bermúdez
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Jorge H. Botero
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Gustavo Alonso Cabrera
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Víctor Cárdenas
University of Texas
El Paso, TX, Estados Unidos

Alberto Concha-Eastman
Guatapé, Colombia

Zoilo Cuéllar
Academia Nacional de Medicina
Bogotá, D.C., Colombia

Luis Gabriel Cuervo
Organización Panamericana
de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Patricia del Portillo
Corpogén
Bogotá, D.C., Colombia

Andrés de Francisco
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

Fernando De la Hoz
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

José Luis Di Fabio
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Jorge Hernando Donado
Universidad Pontificia Bolivariana
Medellín, Colombia

Carlos Andrés Fandiño
Universidad del Valle
Cali, Colombia

José Figueroa
World Health Organization
Ginebra, Suiza

Luis Fernando García
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Alberto Gómez
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

Enrique González
University of Texas Health Science Center
at San Antonio
San Antonio, TX, Estados Unidos

John Mario González
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

Felipe Guhl
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

Antonio Iglesias
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Jorge Jara
Centers for Disease Control and
Prevention, Regional Office for
Central America and Panama,
CDC-CAP
Ciudad de Guatemala, Guatemala

Ernesto Jaramillo
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

Marcelo Labruna
Universidade de São Paulo
São Paulo, Brasil

Jairo Lizarazo
Hospital Universitario Erasmo Meoz
Cúcuta, Colombia

Juan Guillermo McEwen
Corporación para Investigaciones
Biológicas
Medellín, Colombia

Roberto Mendoza
The Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario, Canada

Álvaro Moncayo
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

Ricardo Negroni
Hospital de Infecciosas
Francisco Javier Muñiz
Buenos Aires, Argentina

María Teresa Ochoa
University of California Los Ángeles
Los Ángeles, CA, Estados Unidos

Juan P. Olano
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

Blanca Restrepo
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

Gerzaín Rodríguez
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad de la Sabana
Bogotá, D.C., Colombia

Víctor E. Reyes
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo C. Román
Methodist Neurological Institute
Houston, TX, Estados Unidos

Pedro Romero
Ludwig Center for Cancer Research
University of Lausanne
Lausana, Suiza

Álvaro Ruiz
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

Gioconda San Blas
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

Álvaro Sanabria
Hospital Pablo Tobón Uribe
Medellín, Colombia
Universidad de la Sabana
Chía, Colombia

Ricardo Sánchez
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Nancy Gore Saravia
Centro Internacional de Entrenamiento
e Investigaciones Médicas
Cali, Colombia

Robert Tesh
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Bruno Travi
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo Valbuena
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Juan Miguel Villalobos
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

Moisés Wasserman
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Carlos Arturo Hernández	Linda Grace Molano	Martha Renza	Elizabeth Guzmán	Johanna Morales
Edición y corrección de estilo	Asistencia editorial	Corrección de estilo	Mercadeo digital	Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

La revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud es una publicación trimestral, eminentemente científica. Está amparada por la resolución número 003768 de 1981, emanada del Ministerio de Gobierno, y con tarifa postal reducida según resolución número 1128 del 5 de mayo de 1982.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir sus artículos ni sus resúmenes sin previa autorización escrita del editor. Ni la revista, ni el Instituto asumen responsabilidad alguna por los puntos de vista expresados por los autores. La revista no publicará ningún tipo de propaganda comercial. Los nombres de equipos, materiales y productos manufacturados que eventualmente puedan mencionarse, no implican recomendación ni propaganda para su uso y sólo se mencionan como identificación genérica.

La revista *Biomédica* aparece reseñada en *Index Medicus/Medline de la National Library of Medicine,* en el *Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)* y *Journal Citation Reports/Science Edition de Thomson Scientific,* en SciELO Colombia *(Scientific Electronic Library Online)*, en el índice de la *Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud* (LILACS), en la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal *(*RedAlyC*)*, en el *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas* (Imbiomed), en *Scopus* de Elsevier B.V., en el *Sistema de Información Bibliográfica Regional Andina (*SIBRA*)*, en *CAB Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology*, y forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas* (LATINDEX).

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Avenida Calle 26 No. 51-20
Apartado aéreo 80334 y 80080
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

URL: http://www.ins.gov.co
biomedica@ins.gov.co

Contenido

Editorial

Manejo integrado de los riesgos ambientales y el control de vectores: una nueva propuesta para la prevención sostenible y el control oportuno de las enfermedades transmitidas por vectores
Julio César Padilla, Raúl Pardo, Jorge Alberto Molina 7

Nota editorial

Biomédica en Publindex, 15 de septiembre de 2017 a septiembre de 2019
Comité Editorial 12

Imágenes en biomedicina

Insectos vectores de agentes infecciosos
Raúl Pardo, Olga Lucía Cabrera, Ronald López, Marco F. Suárez 15

Artículo original

Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016
Julio César Padilla, Fredy Eberto Lizarazo, Olga Lucía Murillo, Fernando Antonio Mendigaña, Edwin Pachón, Mauricio Javier Vera 27

Distribución espacial de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en el área rural de dos municipios de Cundinamarca, Colombia
Laura Cabezas, Wilson Cabanzo, Fernando Santa, Víctor Alberto Olano, Diana Sarmiento, Sandra Vargas, Juan Felipe Jaramillo, Thor-Axel Stenstrom, Hans J. Overgaard, María Inés Matiz 41

Acción insecticida de análogos sintéticos de girgensohnina y de aceites esenciales sobre *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)
Juliana Cuadros, Aurora L. Carreño, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny E. Duque 50

Distribución espacial de criaderos positivos y potenciales de *Aedes aegypti*
Daniel Elías Cuartas, Genny Martínez, Diana María Caicedo, Jhonny Garcés, Yoseth Ariza-Araújo, Miguel Peña, Fabián Méndez 59

Ensayos de sensibilidad de larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* frente al nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en condiciones de laboratorio
Carolina Ulvedal, María Alejandra Bertolotti, Susana Raquel Cagnolo, Walter Ricardo Almirón 67

Parámetros biológicos de *Meccus phyllosomus phyllosomus* (Burmeister) 1835, de *Triatoma recurva* (Stål) 1868 (Hemiptera, Reduviidae) y de sus híbridos de laboratorio
Lizbeth Díaz, Karen Covarrubias, Ángel Licón, Mixtli Astorga, Yaneth Moreno, José Alejandro Martínez 77

Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoi majuscula* y *Lutzomyia trapidoi*
Jazzmín Arrivillaga-Henríquez, Sandra Enríquez, Vanessa Romero, Gustavo Echeverría, Jorge Pérez-Barrera, Ana Poveda, Juan-Carlos Navarro, Alon Warburg, Washington Benítez 83

Abundancia, composición e infección natural de mosquitos *Anopheles* en dos regiones endémicas para malaria en Colombia
Carolina Montoya, Priscila Bascuñán, Julián Rodríguez-Zabala, Margarita M. Correa 98

Análisis espacio-temporal de las condiciones biofísicas y ecológicas de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en la region nororiental de los Andes de Colombia
Jaime Badel-Mogollón, Laura Rodríguez-Figueroa, Gabriel Parra-Henao 106

Anopheles darlingi Root 1926 (Diptera: Culicidae): variaciones morfométricas en alas y patas de poblaciones de Colombia
Miguel Alfonso Pacheco, Ranulfo González, Helena Luisa Brochero 124

Infección de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) con el genotipo asiático-americano del virus del dengue serotipo 2 en Medellín y su posible papel como vector del dengue en Colombia
Andrés Gómez-Palacio, Juan Suaza-Vasco, Sandra Castaño, Omar Triana, Sandra Uribe 135

Señal filogenética de la región *Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* en *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913
Andrés López-Rubio, Juan David Suaza, Charles Porter, Sandra Uribe, Gabriel Bedoya, Iván Darío Vélez 143

Vigilancia virológica de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* y *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* como apoyo para la adopción de decisiones en el control del dengue en Medellín
Juliana Pérez-Pérez, William H. Sanabria, Carolina Restrepo, Raúl Rojo, Enrique Henao, Omar Triana, Ana María Mejía, Sandra M. Castaño, Guillermo L. Rúa-Uribe 155

Detección de unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* en triatominos recolectados en diferentes regiones naturales de Perú
Carlos P. Padilla, Uriel Alvarado, Gladis Ventura, Deysi Luna-Caipo, Marcial Suárez, José R. Tuñoque, Nancy Ruelas-Llerena, Luis A. Fachin, Alina Huiza, Lizandro Gonzales, Julio César Carranza, Gustavo Adolfo Vallejo, Abraham G. Cáceres 167

Efecto del tipo y del número de lavados en la eficacia de mosquiteros tratados con deltametrina de larga duración para el control de *Aedes aegypti* en Girardot, Colombia
Diana García, Lucas Alcalá, Juliana Quintero, Sebastián Cortés, Helena Brochero, Gabriel Carrasquilla 180

Comunicación breve

Estimación del tiempo límite de detección del gen citocromo b de humanos en hembras de *Lutzomyia evansi*
José Gabriel Vergara, Daniel Verbel-Vergara, Ana Milena Montesino, Alveiro Pérez-Doria, Eduar Elías Bejarano 187

Detección del virus del dengue en larvas y pupas de *Aedes aegypti* recolectadas en áreas rurales del municipio de Anapoima, Cundinamarca, Colombia
Myriam Lucía Velandia-Romero, Víctor Alberto Olano, Carolina Coronel-Ruiz, Laura Cabezas, María Angélica Calderón-Peláez, Jaime Eduardo Castellanos, María Inés Matiz 193

Bionomía de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albimanus* (Diptera: Culicidae) en dos rancherías del pueblo wayúu, Riohacha, La Guajira, Colombia
Airleth Sofía Díaz, Aura Isabel Sotelo, Catalina González-Uribe, Helena L. Brochero 201

Detección de *Leishmania* (*V*) *guyanensis* en ejemplares de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) recolectados en pecaríes de collar (*Pecari tajacu*)
Jesús E. Rojas-Jaimes, Germán H. Correa-Núñez, Nyshon Rojas-Palomino, Omar Cáceres-Rey 208

Especies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) recolectados en reservas naturales de las regiones del Darién y del Pacífico en Colombia
Rafael J. Vivero, María Angélica Contreras, Juan D. Suaza, Iván D. Vélez, Charles Porter, Sandra I. Uribe 215

Revisión de tema

Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades
Sergio Andrade-Ochoa, Luvia E. Sánchez-Torres, Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón, Alejandro D. Camacho, Benjamín Nogueda-Torres 224

Instrucciones a los autores

Contents

Editorial

Integrated management of environmental risks and vector control: A new proposal fo sustainable prenvention and timely control of vector-bourne diseases
Julio César Padilla, Raúl Pardo, Jorge Alberto Molina 7

Editorial note

Biomédica in Publindex, from September 15, 2017 to September 2019
Editorial Board 12

Images in biomedicine

Vector insects of infectious agents
Raúl Pardo, Olga Lucía Cabrera, Ronald López, Marco F. Suárez 15

Original articles

Transmission scenarios of major vector-borne diseases in Colombia, 1990-2016
Julio César Padilla, Fredy Eberto Lizarazo, Olga Lucía Murillo, Fernando Antonio Mendigaña, Edwin Pachón, Mauricio Javier Vera 27

Spatial distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the rural area of two municipalities of Cundinamarca, Colombia
Laura Cabezas, Wilson Cabanzo, Fernando Santa, Víctor Alberto Olano, Diana Sarmiento, Sandra Vargas, Juan Felipe Jaramillo, Thor-Axel Stenstrom, Hans J. Overgaard, María Inés Matiz 41

Insecticidal action of synthetic girgensohnine analogues and essential oils on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)
Juliana Cuadros, Aurora L. Carreño, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny E. Duque 50

Spatial distribution of potential and positive *Aedes aegypti* breeding sites
Daniel Elías Cuartas, Genny Martínez, Diana María Caicedo, Jhonny Garcés, Yoseth Ariza-Araújo, Miguel Peña, Fabián Méndez 59

Laboratory susceptibility tests of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae to the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*
Carolina Ulvedal, María Alejandra Bertolotti, Susana Raquel Cagnolo, Walter Ricardo Almirón 67

Biological parameters of *Meccus phyllosomus phyllosomus* (Burmeister), 1835, *Triatoma recurva* (Stål), 1868 (Hemiptera, Reduviidae) and their laboratory hybrids
Lizbeth Díaz, Karen Covarrubias, Ángel Licón, Mixtli Astorga, Yaneth Moreno, José Alejandro Martínez 77

Eco-epidemiological aspects, natural detection and molecular identification of *Leishmania* spp. in *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoi majuscula* and *Lutzomyia trapidoi*
Jazzmín Arrivillaga-Henríquez, Sandra Enríquez, Vanessa Romero, Gustavo Echeverría, Jorge Pérez-Barrera, Ana Poveda, Juan-Carlos Navarro, Alon Warburg, Washington Benítez 83

Abundance, composition and natural infection of *Anopheles* mosquitoes from two malaria-endemic regions of Colombia
Carolina Montoya, Priscila Bascuñán, Julián Rodríguez-Zabala, Margarita M. Correa 98

Spatio-temporal analysis of the biophysical and ecological conditions of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the northeast region of Colombia
Jaime Badel-Mogollón, Laura Rodríguez-Figueroa, Gabriel Parra-Henao 106

Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) Rood 1926: Morphometric variations in wings and legs of populations from Colombia
Miguel Alfonso Pacheco, Ranulfo González, Helena Luisa Brochero 124

Aedes albopictus (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellín suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia
Andrés Gómez-Palacio, Juan Suaza-Vasco, Sandra Castaño, Omar Triana, Sandra Uribe 135

Phylogenetic signal at the *Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* mitochondrial region in *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913
Andrés López-Rubio, Juan David Suaza, Charles Porter, Sandra Uribe, Gabriel Bedoya, Iván Darío Vélez 143

Virological surveillance of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* as support for decision making for dengue control in Medellín
Juliana Pérez-Pérez, William H. Sanabria, Carolina Restrepo, Raúl Rojo, Enrique Henao, Omar Triana, Ana María Mejía, Sandra M. Castaño, Guillermo L. Rúa-Uribe 155

Identifying *Trypanosoma cruzi* discreet typing units in triatomines collected in different natural regions of Perú
Carlos P. Padilla, Uriel Alvarado, Gladis Ventura, Deysi Luna-Caipo, Marcial Suárez, José R. Tuñoque, Nancy Ruelas-Llerena, Luis A. Fachin, Alina Huiza, Lizandro Gonzales, Julio César Carranza, Gustavo Adolfo Vallejo, Abraham G. Cáceres 167

Effect of the type and number of washes in the efficacy of long lasting insecticidal nets for *Aedes aegypti* control in Girardot, Colombia
Diana García, Lucas Alcalá, Juliana Quintero, Sebastián Cortés, Helena Brochero, Gabriel Carrasquilla 180

Brief communication

Estimation of time detection limit for human cytochrome b in females of *Lutzomyia evansi*
José Gabriel Vergara, Daniel Verbel-Vergara, Ana Milena Montesino, Alveiro Pérez-Doria, Eduar Elías Bejarano 187

Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia
Myriam Lucía Velandia-Romero, Víctor Alberto Olano, Carolina Coronel-Ruiz, Laura Cabezas, María Angélica Calderón-Peláez, Jaime Eduardo Castellanos, María Inés Matiz 193

Bionomics of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albimanus* (Diptera: Culicidae) in two villages of the Wayúu people, Riohacha, La Guajira, Colombia
Airleth Sofía Díaz, Aura Isabel Sotelo, Catalina González-Uribe, Helena L. Brochero 201

Detection of *Leishmania (V) guyanensis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) collected from *Pecari tajacu*
Jesús E. Rojas-Jaimes, Germán H. Correa-Núñez, Nyshon Rojas-Palomino, Omar Cáceres-Rey 208

Species of sand flies (Diptera: Psychodidae) collected from natural reserves in the Pacific and Darien regions of Colombia
Rafael J. Vivero, María Angélica Contreras, Juan D. Suaza, Iván D. Vélez, Charles Porter, Sandra I. Uribe 215

Topic review

Essential oils and their components as an alternative in the control of mosquito vectors of disease
Sergio Andrade-Ochoa, Luvia E. Sánchez-Torres, Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón, Alejandro D. Camacho, Benjamín Nogueda-Torres 224

Instructions for authors

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, Suplemento No. 2, Entomología médica - Bogotá, D.C., Colombia - Octubre de 2017

Editorial

Manejo integrado de los riesgos ambientales y el control de vectores: una nueva propuesta para la prevención sostenible y el control oportuno de las enfermedades transmitidas por vectores

Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17 % de todas las enfermedades infecciosas del mundo y cada año causan más de un millón de defunciones a nivel mundial. En las Américas, ponen en riesgo la salud de una de cada dos personas. Por la elevada carga social y económica que imponen a la población en riesgo, actualmente, las enfermedades transmitidas por vectores de mayor importancia son la malaria y el dengue, seguidas de las leishmaniasis y la enfermedad de Chagas (1).

Se estima que cerca de 3.300 millones de personas se encuentran en riesgo de padecer malaria, y se presentan 198 millones de casos de esta enfermedad (rango: 124 a 283 millones). Además, en el mundo ocurren unas 584.000 muertes (rango: 367.000 a 755.000) por malaria, la gran mayoría en niños africanos menores de cinco años (2).

A su vez, más de la mitad de población mundial –3.900 millones de personas– viven en zonas donde hay riesgo de contraer dengue, distribuidas en 128 países endémicos donde se presentan unos 390 millones de infecciones (96 millones de ellas sintomáticas) y 20.000 muertes por dengue al año, predominantemente a nivel urbano (3).

Las leishmaniasis se presentan en tres formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral. Aproximadamente, 350 millones de personas se encuentran en riesgo por leishmaniasis, y anualmente ocurren entre 700.000 y un millón de casos nuevos de esta enfermedad, con 20.000 a 30.000 muertes, principalmente debidas a la forma visceral de la enfermedad (4,5).

Otra enfermedad transmitida por vectores con una carga presupuestal importante para los sistemas de salud es la enfermedad de Chagas, con más de 6 millones de casos (6), incluidos los cerca de 300.000 casos que se presentan en Estados Unidos (7). El impacto de la enfermedad de Chagas fuera de la América endémica se ha dejado sentir en Europa, donde se estima que hay de 68.000 a 120.000 personas que la padecen (8).

En Colombia, se reconocen cerca de 20 agentes etiológicos y un número similar de vectores para las cuatro principales enfermedades transmitidas por vectores. La malaria es un evento endemo-epidémico persistente en áreas rurales dispersas de municipios de las diferentes regiones situadas a menos de 1.500 msnm. Se producen anualmente entre 60 y 100.000 casos, pero en la última década se evidenció una reducción cercana al 50 %. La mortalidad ha mantenido una tendencia descendente, registrándose en promedio entre 20 y 30 muertes anuales por esta causa.

Asimismo, el dengue mantiene una transmisión endemo-epidémica persistente, pero con incrementos paulatinos de la endemia, con patrones de transmisión focalizados y dispersos en áreas urbanas, situadas a menos de 2.200 msnm. Anualmente se registran entre 60 a 100.00 casos de esta virosis, 5 a 10 % de los cuales son casos de dengue grave, y ocurren más de 40 muertes por esta causa (9,10).

Las leishmaniasis también son endemo-epidémicas, con un aumento importante del número de casos desde la década del 2000 y patrones de transmisión variables, desarrollados principalmente en focos rurales enzoóticos ubicados por debajo de los 1.800 msnm (11). De las tres formas clínicas, la cutánea es ampliamente dominante, con más del 95 % de los casos, y en los últimos diez años se han registrado anualmente entre 9.000 y 15.000 casos de leishmaniasis cutánea (Sivigila, Instituto Nacional de Salud, periodo 2007-2016).

Por su parte, la enfermedad de Chagas se presenta en zonas endémicas de transmisión localizadas por debajo de los 2.000 msnm (12), con una prevalencia de infección humana de 1,3 millones de personas y alrededor de 3,5 millones de habitantes en riesgo de adquirir la infección tomando como base la distribución de los insectos vectores (13).

La distribución e intensidad de las diferentes enfermedades transmitidas por vectores está determinada por una compleja y dinámica interacción de factores condicionantes biológicos, geográficos y ambientales que determinan el establecimiento de áreas geográficas adecuadas de transmisión rural, periurbana y urbana. En todos estos espacios se desarrollan procesos sociales, económicos, políticos, biológicos y culturales cuya interacción favorece la transmisión endémica, emergente, reemergente y epidémica.

En los últimos años, la globalización de los desplazamientos y el comercio, el cambio climático, la urbanización de la población, los asentamientos no planificados, la limitación de los servicios básicos de calidad, los comportamientos y las prácticas culturales a nivel urbano favorecen la transmisión endemo-epidémica persistente del dengue y la emergencia de otras arbovirosis, como lo han podido evidenciar las recientes epidemias de chikungunya y Zika. Igualmente, la explotación irracional de la minería ilegal y los cultivos ilícitos y el gran deterioro ambiental que conllevan, así como los desplazamientos de poblaciones sensibles y de portadores, se contarían entre los principales factores que explican la dinámica de la transmisión de enfermedades como la malaria, las leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la fiebre amarilla (14).

Históricamente, algunas iniciativas lideradas por la Fundación Rockefeller y la Organización Mundial de la Salud han promovido estrategias de control puntual, eliminación y erradicación de la malaria y el dengue a nivel mundial. En la década de 1950, la disponibilidad de insecticidas, como el DDT, y de medicamentos sintéticos, así como los resultados de experiencias exitosas permitieron la implementación de campañas de erradicación del dengue y la malaria con resultados diversos (15,16). A pesar de ello, en varios países el aumento de la resistencia de los vectores a los insecticidas dio como resultado el fracaso de las campañas para eliminar la malaria (16). El enfoque del control de vectores basado en insecticidas significaba que la gestión ambiental y otros métodos alternativos no se explotaban o, incluso, se olvidaban. Sin embargo, entre los años de 1950 y 1970, como consecuencia de esta política, se interrumpió la transmisión del dengue y en una fase inicial se redujo la malaria en la mayoría de los países de las Américas, pero estos resultados no fueron sostenibles en el tiempo.

En la década de 1960, en Colombia, también se atribuyó a estas campañas de erradicación la desaparición del dengue endémico durante cerca de 20 años (17), y una importante reducción del número de casos de malaria, la cual alcanzó los niveles más bajos de transmisión endémica, cerca de 9.000 casos por año (18).

En este sentido, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera que los programas de erradicación fundamentados en el control químico de los vectores fracasaron en la región debido a que no todos los países resolvieron erradicar el mosquito *Aedes aegypti,* y los que estaban infestados se convirtieron en fuentes de reinfestación para los que estaban libres del vector. En la mayoría de los países que lograron la erradicación, los programas contra *A. aegyti* perdieron importancia política y la vigilancia para detectar oportunamente la reinfestación se redujo gradualmente. Cuando esta se descubría, por lo general se reaccionaba demasiado tarde, y los recursos solían ser insuficientes para eliminarla antes de que se generalizara y su control fuera imposible (19).

En la década de 1990 se intentó la implementación de la estrategia de “Manejo integrado y selectivo de vectores” (20), la cual se fundamentó en la combinación de las medidas de control dirigidas a combatir los vectores específicos de enfermedades, pero no pudo consolidarse debido a que se mantuvo el enfoque de control químico de vectores utilizado durante las campañas de erradicación (21, 22).

Con el inicio del nuevo milenio se planteó el manejo integrado de vectores, basado en una aproximación más flexible, racional e integral, el cual tenía en cuenta el control simultáneo de los diversos insectos transmisores de las principales enfermedades transmitidas por vectores presentes en los lugares endémicos del territorio nacional. Sin embargo, en Colombia, y en la mayoría de los países de la región, los avances han sido lentos debido a la existencia de algunas barreras operativas que dificultan su inclusión definitiva en la rutina de los programas.

Uno de los mayores inconvenientes para la implementación sostenible de este tipo de estrategias operativas es la persistencia en la aplicación empírica del control vectorial como herramienta fundamental de control y la ausencia de acciones regulares y sostenibles de prevención. A ello ha contribuido la herencia mencionada del recurso a campañas prolongadas de erradicación sustentadas en el control químico y la experiencia histórica acumulada del empleo del control vectorial en situaciones de contingencia, el enfoque centrado en cada enfermedad por separado, y la desarticulación de las políticas para el manejo del medio en los entornos escolares, familiares, laborales y otros. En el país, este tipo de situaciones se ha podido evidenciar mejor durante las epidemias de dengue en el 2010, de malaria en el 2016 (21,22), de leishmaniasis cutánea en Chaparral (Tolima) (23) y en algunos de los brotes de Chagas agudo en los últimos años (24-26).

En el marco de la estrategia de gestión integrada de prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores, particularmente en los componentes de promoción y prevención del manejo integrado de vectores, la iniciativa de entornos saludables y la experiencia adquirida en la implementación de estrategias similares de manejo del medio, el Programa Nacional de Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores ha propuesto un nuevo enfoque con una propuesta operativa práctica y racional que le da mayor importancia al manejo integrado de riesgos ambientales y hace énfasis en la prevención y el control oportuno y efectivo de vectores, estrategia que se denomina “Manejo integrado de riesgos ambientales y control de vectores” (MIRACV) (27-29).

Para garantizar el éxito de dicha estrategia, se deben tener en cuenta algunas barreras persistentes en el manejo de las enfermedades transmitidas por vectores, tales como el predominio del enfoque de control tradicional, la falta de regularidad de las acciones de prevención y su poca sostenibilidad, la actitud paternalista del Estado y la aceptación de la comunidad producto de la muy frecuente percepción de que no tiene responsabilidad frente a las problemáticas de las enfermedades transmitidas por vectores y, además, la falsa creencia arraigada en parte de la población de que la aplicación de insecticidas es la solución a los brotes o epidemias de dichas enfermedades.

Frente a estas situaciones, la solución debe orientarse a lograr la concertación con los sectores sociales e institucionales involucrados en el problema y la coordinación de las políticas sectoriales para darle sostenibilidad a las acciones de promoción y prevención de los factores determinantes del problema a mediano y largo plazo. Para ello, se requiere una reorganización técnico-administrativa que garantice una mejor capacidad institucional de los programas regulares y sus grupos funcionales y operativos a nivel local basada en el trabajo multidisciplinario en equipo de entomología, inteligencia epidemiológica, veterinaria y servicios de salud, entre otros. Así, todas las enfermedades transmitidas por vectores prevalentes en las diferentes áreas geográficas de transmisión serán objeto de actividades sostenibles e integrales, pues se combatirán simultáneamente los diferentes vectores en cada entorno de transmisión regional, lo cual contribuirá a alcanzar las metas del Plan Decenal de Salud Pública (30).

Por último, es importante resaltar elementos clave del MIRACV como la adaptación de las estrategias e intervenciones a la epidemiología, la ecología y los recursos locales, con base en la información comprobada proveniente de la investigación operacional, la evaluación rutinaria y la adopción de los principios de la estrategia en el diseño de políticas saludables con la participación de los diferentes sectores institucionales y de las organizaciones de la sociedad civil. Además, la estrategia también requiere del fortalecimiento de los controles normativos y legislativos en salud pública y la promoción del empoderamiento de la población afectada, así como la colaboración dentro del sector de la salud y con otros sectores para optimizar los recursos disponibles y la adopción oportuna de decisiones, el fortalecimiento de los canales de comunicación entre los responsables políticos, los administradores de los programas y otros socios. Otro aspecto es el uso racional y la integración inteligente de los métodos químicos y biológicos de control de vectores, y de prevención de los riesgos ambientales que favorecen la proliferación de vectores transmisores de enfermedades de importancia en salud pública.

Julio César Padilla
Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá, D.C., Colombia

Raúl Pardo
Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Jorge Alberto Molina
Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

Referencias

1. **Organización Mundial de la Salud.** Enfermedades Transmitidas por Vectores. Nota descriptiva Nº 387. Geneva: OMS; 2016. Fecha de consulta: 15 de enero de 2017. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/.
2. **Organización Mundial de la Salud.** Informe mundial sobre el paludismo, 2015. Fecha de consulta: 15 de enero de 2017. Disponible en: ww.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/es/.
3. **Organización Panamericana de la Salud**/**Organización Mundial de la Salud.** Dengue: datos estadísticos y epidemiología. Descripción de la situación epidemiológica en las Américas. Fecha de consulta: 30 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=es.
4. **World Health Organization.** Leishmaniasis, fact sheet. Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2017. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/.
5. **Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN.** Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. J Transl Int Med. 2015;3:43-50.
6. **Dumonteil E, Herrera C.** Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:0005422. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005422.
7. **Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt-Cravioto M, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, *et al.*** An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2300. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002300.
8. **Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DA, *et al.*** Prevalence of Chagas disease in Latin American migrants living in Europe: A systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:e0003540. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540.
9. **Instituto Nacional de Salud.** Malaria. Boletín Epidemiológico, semana 52 de 2016. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2016. p. 98-100. Fecha de consulta: 6 de enero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletinepidemiologico/Paginas/default.aspx.
10. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico, semana 52 de 2016: Dengue. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2016. p. 98-100. Fecha de consulta: 6 de enero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletinepidemiologico/Paginas/default.aspx.
11. **Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Guía para la atención clínica integral de paciente con leishmaniasis. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2010.
12. **Guhl F, Restrepo M, Angulo VM, Antunes CMF, Campbell-Lendrum D, Davies CR.** Lessons from a national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. Trends Parasitol. 2005;21:259-62.
13. **Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D.** Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica. 2007;27(Supl.1):143-62.
14. **Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ.** Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. Biomédica. 2017;37(Supl.2):27-40.
15. **Ministerio de Salud y Protección Social**. Informe Objetivos de Desarrollo del Milenio. Bogotá: Dirección de Promoción y Prevención; 2015.
16. **Organización Panamericana de la Salud.** Informe de la campaña de erradicación de *Aedes aegypti* en las Américas. Publicaciones varias N° 48. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1960. p. 8-10.
17. **Franco-Agudelo S.** El paludismo en América Latina. Guadalajara, Jalisco: Editorial de la Universidad de Guadalajara; 1990.
18. **Boshell J, Groot H, Gacharná M, Márquez G, González M, Gaitán M, *et al.*** Dengue en Colombia. Biomédica.1986;6:101-6.
19. **Padilla JC, Álvarez G, Montoya R, Chaparro P, Herrera S.** Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(Suppl.1):114-22.
20. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Publicación científica N° 548. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1995. p. 35.
21. **Organización Panamericana de la Salud**/**Organización Mundial de la Salud, OPS**/**OMS.** Control selectivo de vectores de malaria: guía para el nivel local de los sistemas de salud. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1999.
22. **Instituto Nacional de Salud.** Comportamiento epidemiológico del dengue en Colombia, 2010. Fecha de consulta: 29 de septiembre de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/Dengue%202010.pdf.
23. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento malaria hasta el periodo XIII, Colombia, 2016. Fecha de consulta: 29 de septiembre de 2017. Disponible en:http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Paginas/informes-de-evento.aspx.
24. **Pardo RH, Cabrera OL, Becerra J, Fuya P, Ferro C.** *Lutzomyia longiflocosa*, posible vector en un foco de leishmaniasis cutánea en la región subandina del departamento del Tolima, Colombia, y el conocimiento que tiene la población sobre este insecto. Biomédica. 2016;26(Supl.1):95-108.

25. **Nicholls RS, Cucunubá ZM, Montilla M, Flórez AC.** Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, 2006. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2007;12:367-78.

26. **Nicholls RS, Cucunubá ZM, Knudson A, Flórez AC, Montilla M, Puerta CJ, Pavía PX.** Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada. Informe de 10 casos presentados en el período 2002 a 2005. Biomédica. 2007;27(Supl.1):8-17.

27. **Dias ML, Leal S, Mantilla JC, Molina-Berrios A, López-Muñoz R, Solari A, *et al*.** Acute Chagas outbreaks: Molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. Parasit Vectors. 2015;8:608. doi 10.1186/s13071-015-1218-2.

28. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Estrategia de gestión integral para la promoción, prevención y control de las ETV en Colombia, 2012-2021. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2014.

29. **World Health Organization**. Handbook for Integrated Vector Management. Washington, D.C.: World Health Organization; 2012.

30. **Organización Panamericana de la Salud.** Desarrollo de la estrategia de entorno saludable. Fecha de consulta: 24 de febrero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=1055&Itemid=460.

31. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Plan Decenal de Salud Pública, 2012-2021. Fecha de consulta: 23 de febrero de 2017. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20%20Documento%20en%20consulta%20para%20aprobaci%C3%B3n.pdf.

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, Suplemento No. 2, Entomología médica - Bogotá, D.C., Colombia - Octubre de 2017

Nota editorial

Biomédica en Publindex, 15 de septiembre de 2017 a septiembre de 2019

Publindex es el índice bibliográfico nacional del Departamento Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) de Colombia. El 16 de agosto de 2016, Colciencias publicó la "Convocatoria para la indexación de revistas científicas colombianas especializadas - Publindex" (Convocatoria 768 de 2016) (1), con el propósito de clasificar las revistas científicas colombianas con base en el "Modelo de clasificación de revistas científicas nacionales 2016". Los resultados de dicha convocatoria se presentaron el 15 de septiembre de 2017 (2).

En la mencionada clasificación se tuvo en cuenta, entre otros criterios, la inclusión de las revistas en los índices ISI o SCOPUS, así como en el *Journal Citation Report* (JCR) o en el *Scimago Journal Ranking* (SJR) para aquellas que tuvieran asignado un cuartil específico (Q1, Q2, Q3 o Q4) en dichos índices. En la categorización, también se incluyó el indicador de impacto y visibilidad de las publicaciones seriadas denominado 'índice H5', el cual se calcula por el número de citas recibidas por artículo entre el 1° de enero de 2012 y el 31 de diciembre de 2016, según los datos registrados en *Google Scholar*. Con base en estos criterios, Colciencias estableció cuatro categorías: A1, A2, B y C, y asignó a cada revista la categoría asociada al cuartil reportado en el JCR o el SJR. A la revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud, Colciencias le asignó la categoría A2, es decir, la correspondiente al cuartil Q2 reportado en el SJR.

En el informe de los resultados de la Convocatoria 768 del 2016, se señala que participaron 627 revistas y, de estas, 583 recibieron el aval de su institución editora. La mayor participación de revistas se registró en el área de las ciencias sociales (45 %), seguida por las del área de las ciencias médicas y de la salud (32 %). De las 583 revistas que Colciencias analizó, 244 (41,8 %) fueron clasificadas en las siguientes categorías de Publindex: una sola revista en la categoría A1 (*Análisis Político* de la Universidad Nacional de Colombia, revista del área de las ciencias sociales); 14 revistas en la categoría A2 (dos del área de ciencias médicas y de la salud, *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud y *Colombia Médica* de la Universidad del Valle); las otras 12 revistas se distribuyeron en las áreas de humanidades, ciencias sociales, ciencias naturales, ingeniería y tecnología; 105 revistas fueron clasificadas en la categoría B, y 124, en la categoría C (2).

Es importante aclararles a la comunidad científica nacional y a la internacional, y a nuestros lectores, que los resultados de la clasificación de Publindex publicados el 15 de septiembre de 2017 tuvieron en cuenta únicamente la visibilidad y el factor de impacto de las revistas en los índices de citación antes mencionados.

En esta clasificación no se evaluó ni se midió la calidad científica del contenido de las revistas analizadas, ni su calidad editorial; tampoco se tuvo en cuenta la inclusión de las revistas del área de las ciencias médicas y de la salud en el *Index Medicus*, el índice internacional de mayor cobertura e importancia en las ciencias de la salud y biomedicina, en el cual *Biomédica* se encuentra incluida desde abril del 2002.

El *Index Medicus* es uno de los índices más consultados por investigadores y profesionales en ciencias médicas y de la salud, por medio del sistema de búsqueda de libre acceso *PubMed/Medline***,** una plataforma desarrollada por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de la *US National Library of Medicine* (NLM), la cual permite la consulta en las bases de datos bibliográficas *Medline*, *PreMedline*, *Genbank* y *Complete Genoma*, así como el acceso a los resúmenes de los artículos de investigación en salud y biomedicina de más de 160 países, como parte del *Global Query Cross-Database*

Search System (Entrez). Para que una revista sea incluida en el *Index Medicus*, debe cumplir con los estándares internacionales de calidad científica y editorial, los cuales son evaluados por la NML; es el índice internacional de la literatura biomédica mundial y centro de innovación de la información desde su fundación en 1879 (3), y su plataforma *Medline* incluye más de 5.600 revistas publicadas en los Estados Unidos y en más de 85 países.

La inclusión de *Biomédica* en el *Index Medicus* y en los otros índices internacionales se ha logrado gracias al aporte hecho a la revista por los autores, los evaluadores pares, los editores, el Comité Editorial, el Comité Científico, el equipo de asistentes editoriales y las directivas del Instituto Nacional de Salud a lo largo de sus 37 años de publicación ininterrumpida.

Estos aportes han permitido que nuestro desempeño se haya mantenido con los mejores estándares de calidad estipulados para los procesos de evaluación científica y editorial de los manuscritos que se reciben de autores nacionales e internacionales. Este trabajo se refleja, en parte, en la influencia y la función que tiene la revista a nivel nacional y regional, así como en la difusión y la apropiación social de conocimientos que constituyen información estratégica para el desarrollo científico y de políticas públicas de salud en la región, como lo mencionan Suárez-Tamayo y Collazo-Reyes (4).

La revista *Biomédica* espera que, en el futuro próximo, las convocatorias de Publindex para la clasificación de las revistas científicas colombianas, incluyan también otros indicadores que reflejen la influencia regional de las revistas y, en especial, los criterios internacionales de calidad científica y editorial.

Comité editorial
Revista *Biomédica*

Referencias

1. **Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación.** Convocatoria para Indexación de Revistas Científicas Colombianas Especializadas - Publindex. Fecha de consulta: 15 de septiembre de 2017. Disponible en: http://www.colciencias.gov.co/convocatorias/investigacion/convocatoria-para-indexacion-revistas-cientificas-colombianas.
2. **Dirección de Fomento a la Investigación.** Informe de la convocatoria para indexación de revistas científicas colombianas especializadas - Publindex. Septiembre 12 de 2017. Bogotá: Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación. Colciencias. p.1-16.
3. **National Institutes of Health, US National Library of Medicine.** About the National Library of Medicine. Fecha de consulta: 25 de septiembre de 2017. Disponible en: https://www.nlm.nih.gov/about/index.html y https://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/intlmedlars.html.
4. **Suárez-Tamayo LM, Collazo-Reyes F.** Patrones de citación y sitios geográficos de la literatura publicada en Biomédica, 2007-2015. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) e Instituto Politécnico Nacional, México. Memorias, Congreso Internacional de Información 2016. Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba, octubre de 2016.

Biomédica 2017;37(Supl.2):15-26
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3840

IMÁGENES EN BIOMEDICINA

Insectos vectores de agentes infecciosos

Raúl Pardo, Olga Lucía Cabrera, Ronald López, Marco F. Suárez

Grupo de Entomología, Dirección de Investigación en Salud Pública,
Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

El objetivo de este artículo es ilustrar con fotografías *in vivo* material de laboratorio útil para el estudio de la biología, la ecología y el comportamiento de diferentes grupos de insectos hematófagos. Se llama la atención sobre las características morfológicas de larvas, pupas y adultos utilizadas en la taxonomía de los ejemplares, los mecanismos de alimentación de las larvas y las técnicas de marcación de adultos, temas de interés para su estudio y control.

Aunque la mayoría de los ejemplares se obtuvo de las colonias del insectario del Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud, algunos eran silvestres y fueron fotografiados en campo. Hubo necesidad de construir escenarios especiales para obtener las fotografías de cada especie en el laboratorio. Se utilizó una cámara digital Nikon, modelo 7000D, con un lente macro de 105 mm, un lente gran angular de 20 mm en posición invertida y tubos de extensión en diferentes combinaciones.

Queremos expresar nuestros agradecimientos a Johanna Lizeth Morales y a Carlos Arturo Hernández por la selección final de las fotografías, la edición digital y optimización de las mismas, y el diseño y diagramación del artículo.

Aedes aegypti



Cabeza de larva, vista lateral



Últimos segmentos abdominales de la larva con sifón terminal. a) Tubo traqueal. b) Peine: el engrosamiento subapical de cada espina se debe a la presencia de espinas subapicales.



Pupa, obsérvese el tamaño corto de la trompeta respiratoria (flecha) usadas como carácter diagnóstico taxonómico para esta especie.

Correspondencia:
Raúl Pardo, Grupo de Entomología, Instituto Nacional de Salud,
Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700

Recibido: 14/09/17; aceptado: 05/10/17





Dimorfismo sexual: las antenas del macho (izquierda) están densamente pobladas por pelos largos, mientras que en la hembra (derecha) es menor la cantidad de pelos y estos son más cortos.

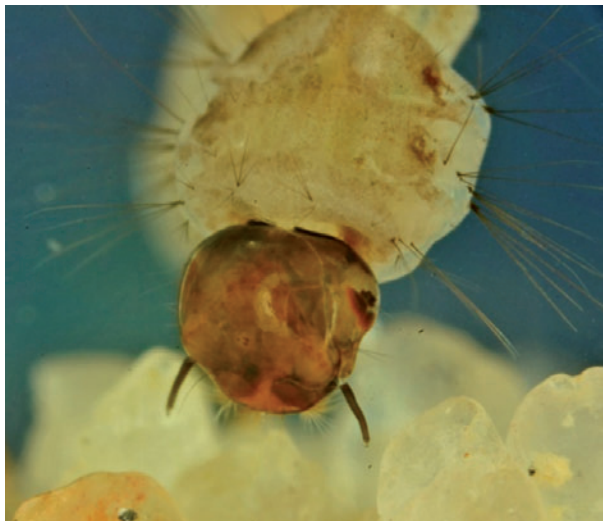


Adulto hembra marcada con polvo fluorescente

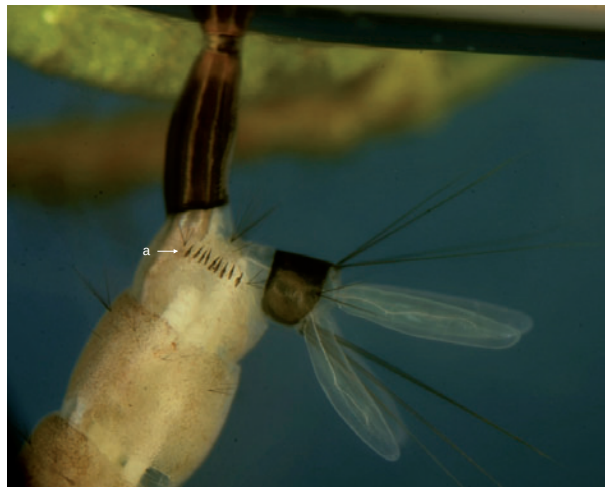


Adulto hembra picando a través de tela tipo lino (0,4 mm de grosor); se ha descrito que la ropa protege de la picadura de insectos aunque depende de la densidad y el espesor del tejido.

Aedes albopictus



Cabeza de la larva, vista frontal



Últimos segmentos abdominales de la larva con sifón terminal. a) Espinas simples del peine. El tamaño del sifón de las especies del género *Aedes* es más corto que en *Culex quinquefasciatus.*



Pupa, vista lateral y vista dorsal en la que se aprecian las paletas natatorias.

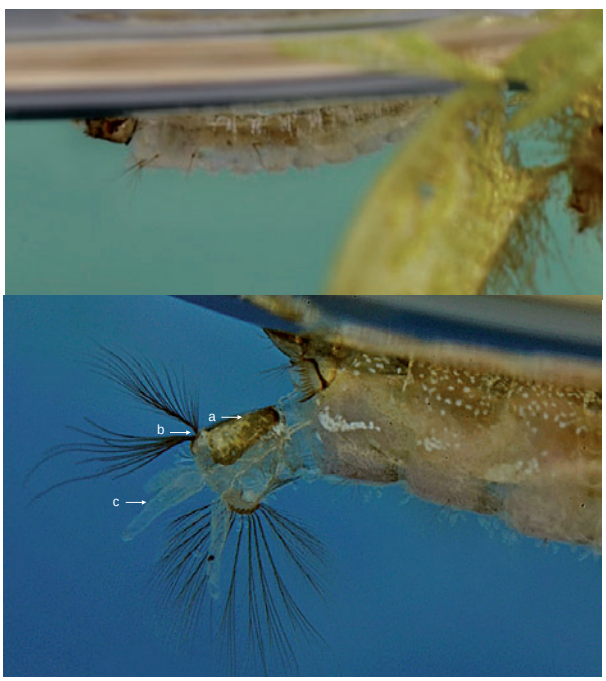




Hembra alimentándose sobre atrayente humano



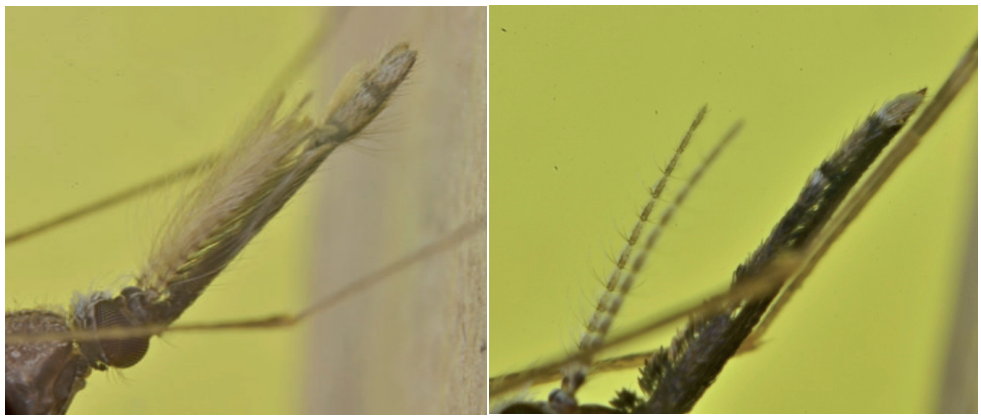
Anopheles albimanus



Larva completa en posición de reposo. No presenta sifón, pero en el octavo segmento del abdomen posee una placa con dos espiráculos para tomar el oxígeno. Esta característica la obliga a adoptar una posición paralela a la superficie del agua.
a) Silla. b) Pelos caudales. c) Branquias anales.



Pupa, vista lateral; detalle de la formación del ojo compuesto; nótese la diferenciación de los omatidios.



Dimorfismo sexual: a la izquierda, adulto macho, y a la derecha, el adulto hembra.

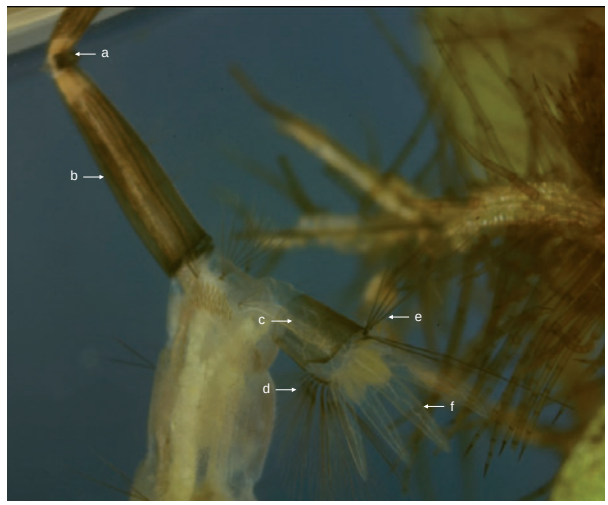


Adulto hembra con el intestino lleno de solución azucarada al 30 % y colorante azul. Esta metodología se utiliza en estudios de dispersión y comportamiento.

Culex quinquefasciatus



Cabeza de larva, vista frontal; se observa el cepillo bucal. Estas estructuras, formadas por largos filamentos, crean corrientes de agua dirigidas hacia el aparato bucal que filtran las partículas orgánicas que se encuentran suspendidas en el agua.



El largo del sifón es cuatro veces su ancho. El sifón permite la toma de oxígeno de la superficie del agua.
a) Válvula espiracular. b) Sifón. c) Silla. d) Cepillo ventral. e) Pelos caudales. f) Branquias anales.



Pupa, vista lateral.
a) Trompeta respiratoria. b) Cefalotórax. c) Abdomen. d) Paletas natatorias. Nótese que la mayoría de las estructuras del cuerpo del adulto ya están formadas.



Adulto hembra con el intestino lleno de solución azucarada al 30 % y colorante amarillo

Lutzomyia spinicrassa



Larva, vista dorsal; nótense las setas en forma de cerilla distribuidas a lo largo de todo el cuerpo. Estas larvas viven en hábitats terrestres en suelos ricos en materia orgánica.



Vista lateral de la cabeza de la larva

Lutzomyia longipalpis



Vista ventral de la larva de IV estadio; su aparato bucal masticador le permite triturar la materia orgánica. Se pueden observar los seudópodos centrales en los segmentos abdominales.



La pupa se fija al sustrato mediante el pseudopodio terminal del noveno segmento abdominal; obsérvese la exuvia del cuarto estadio larval adherida a este segmento.



Adulto macho, nótense los halterios o balancines que se usan para dirigir los movimientos del insecto durante el vuelo.



El adulto macho presenta un par de manchas pálidas en el cuarto terguito donde se ubican las glándulas sexuales que producen las feromonas.



Dimorfismo sexual en flebótomos: los últimos segmentos abdominales están modificados en órganos genitales; a la izquierda, adulto macho, y a la derecha, el adulto hembra.



Adulto hembra, vista ventral



Adulto hembra, nótese el mínimo contacto de los tarsos con la tela del toldillo; no obstante, si están impregnados de insecticidas, es suficiente para obtener su efecto letal.



Adulto hembra marcada con polvo fluorescente y abdomen lleno de sangre



Adulto macho marcado con polvo fluorescente

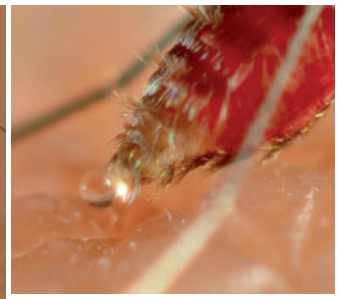


Hembra grávida, el desarrollo de los huevos ocurre después de que las hembras hacen una ingestión completa de sangre.



Adulto macho con intestino lleno de solución azucarada al 30 % y colorante verde





Diuresis de la hembra durante la alimentación sanguínea. Los flebótomos excretan gotas muy pequeñas de solución salina que después de ser expulsadas rápidamente para perder peso, explotan antes de caer.

Lutzomyia longiflocosa

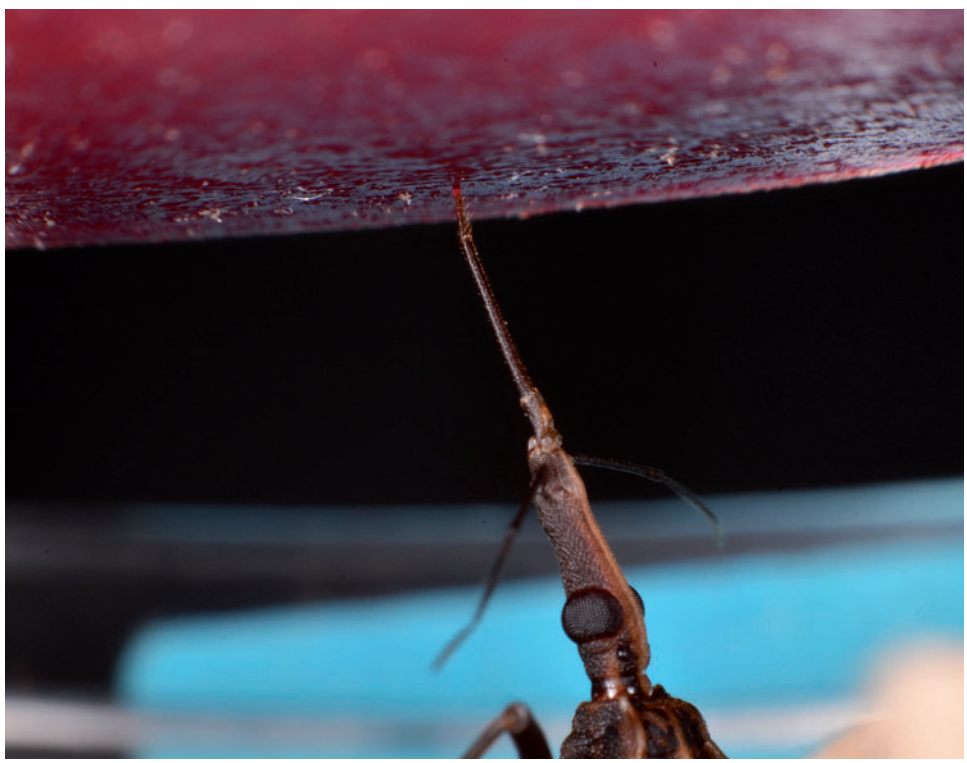


Adulto hembra marcada con polvo fluorescente, alimentándose sobre atrayente humano. Imagen capturada en trabajo de campo en la región subandina de la vereda Venecia, municipio de Campoalegre, departamento del Huila.

Rhodnius prolixus



Cabeza de adulto, variedad de ojos rojos criada en el laboratorio; nótese la diferenciación de omatidios (a) y la presencia de ocelos (b).



Alimentación artificial a través de membrana de intestino de cerdo

Biomédica 2017;37(Supl.2):27-40
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3769

ARTÍCULO ORIGINAL

Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016

Julio César Padilla, Fredy Eberto Lizarazo, Olga Lucía Murillo, Fernando Antonio Mendigaña, Edwin Pachón, Mauricio Javier Vera

Programa de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Las enfermedades transmitidas por vectores representan más de 17 % de todas las enfermedades infecciosas y causan anualmente un millón de defunciones a nivel mundial. En Colombia, la malaria, el dengue, la enfermedad de Chagas y las leishmaniasis son condiciones endemoepidémicas persistentes.
Objetivo. Determinar el comportamiento epidemiológico de las enfermedades transmitidas por vectores en zonas urbanas y rurales de Colombia entre 1990 y 2016.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo del comportamiento epidemiológico de las principales enfermedades transmitidas por vectores en zonas urbanas y rurales de Colombia entre 1990 y 2016, con la información proveniente de fuentes oficiales secundarias.
Resultados. En el periodo estudiado se registraron 5'360.134 casos de enfermedades transmitidas por vectores, de los cuales 54,7 % fueron de malaria y 24,9 % de dengue. Estos casos concentraron el 80 % de la carga acumulada de casos de enfermedades transmitidas por vectores. Las medianas de las tasas de incidencia fueron 1.371 y 188 por 100.00 habitantes para malaria y dengue, respectivamente. Además, los casos de chikungunya fueron 774.831 desde su introducción en el 2014 y, los de Zika, 117.674 desde su aparición en 2015. En las zonas rurales predominaron las enfermedades parasitarias transmitidas por vectores como la malaria, las leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. A nivel urbano, predominaron el dengue, el chikungunya y el Zika.
Conclusiones. La transmisión en Colombia de estas enfermedades es persistente en las zonas urbanas y en las rurales, y de tipo endemoepidémico en los casos de malaria, dengue, leishmaniasis y enfermedad de Chagas. Dicha transmisión se ha dado de manera focalizada y con patrones variables de intensidad. Asimismo, se mantienen las condiciones que han favorecido la transmisión emergente de nuevas arbovirosis.

Palabras clave: vectores de enfermedades; estudios epidemiológicos; factores epidemiológicos; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3769

Transmission scenarios of major vector-borne diseases in Colombia, 1990-2016

Introduction: Vector-borne diseases account for more than 17% of all infectious diseases and annually they cause one million deaths worldwide. In Colombia, malaria, dengue, Chagas disease, and leishmaniasis are persistent endemo-epidemic events.
Objective: To determine the behavior and transmission scenarios of vector-borne diseases in Colombia between 1990 and 2016.
Materials and methods: We conducted a descriptive study on the epidemiological behavior of the main vector-borne diseases in Colombia between 1990 and 2016 based on information from official secondary sources.
Results: During the study period, there were 5,360,144 cases of vector-borne diseases, 54.7% of which were due to malaria and 24.9% to dengue, accounting for 80% of the cumulative disease burden of vector-borne disease cases. The median incidence rates were 1,371 and 188 per 100,000 inhabitants for malaria and dengue, respectively. In addition, emerging events such as Chikungunya registered 774,831

Contribución de los autores:
Julio César Padilla: planeación, ejecución, análisis e interpretación de la información
Fredy Eberto Lizarazo: planeación, recolección, tabulación y análisis de la información de dengue, chikungunya y Zika
Olga Lucía Murillo: planeación, recolección, tabulación y análisis de la información de malaria
Fernando Antonio Mendigaña y Mauricio Javier Vera: planeación, recolección, tabulación y análisis de la información de leishmaniasis
Edwin Pachón y Mauricio Javier Vera: planeación, recolección, tabulación y análisis de la información de la enfermedad de Chagas
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

cases since its introduction in 2014, while 117,674 Zika fever cases were reported since its emergence in 2015. In rural settings, parasitic vector-borne diseases such as malaria, leishmaniasis and Chagas disease predominated, while in urban scenarios dengue, chikungunya and Zika were predominant.
Conclusions: Persistent epidemic and endemic transmission of vector-borne diseases in urban and rural settings in Colombia was observed mainly in the case of malaria, dengue, leishmaniasis and Chagas disease. Such transmission was focused and had variable intensity patterns. On the other hand, the conditions that have favored the emergence of new arboviruses persist.

Key words: Diseases vectors; epidemiologic studies; epidemiologic factors; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3769

Las enfermedades transmitidas por vectores aparecen cuando el agente etiológico que las produce, virus o parásito, es transmitido por especies de insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos alojados en la sangre de un portador infectado y los transmiten a un huésped sensible mediante mecanismos de transmisión activa o pasiva (1-3).

Uno de los mecanismos fundamentales de transmisión activa es la picadura de un artrópodo infectado, en el cual ya ha transcurrido parte del ciclo de vida del agente etiológico (4,5). La transmisión ocurre en espacios físicos delimitados que tienen ciertas características geográficas y ecológicas, y en los cuales se articulan e interactúan diversos factores sociales determinantes que la favorecen (6). Los vectores de enfermedades más conocidos son: los mosquitos del género *Anopheles*, transmisores de la malaria o paludismo; los flebótomos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, transmisores de las leishmaniasis; los chinches o 'pitos' de los géneros *Rhodnius* y *Triatoma*, transmisores de la enfermedad de Chagas, y el mosquito *Aedes aegypti*, transmisor del dengue, el chikungunya y el Zika (7-10).

Estas enfermedades representan más del 17 % de todas las enfermedades infecciosas, causan cada año más de un millón de muertes a nivel mundial y ponen en riesgo la salud de una de cada dos personas en las Américas. Entre las más importantes, se encuentra la malaria y, entre las arbovirosis, el dengue (11,12).

Cerca de 3.300 millones de personas se encuentran en riesgo de padecer paludismo a nivel mundial, y 1.200 millones viven expuestas en áreas rurales con alto riesgo de transmisión. Se estima que ocurren 198 millones (rango: 124 a 283 millones) de casos de malaria y unas 584.000 muertes (rango: 367.000 a 755.000) por esta causa en el mundo, la gran mayoría, en niños africanos menores de cinco años. En las Américas, más de 112 millones de personas se encuentran expuestas a padecer malaria en los 21 países endémicos de la región, y unos 20 millones viven en áreas de alto riesgo de transmisión. En Colombia, se estima que cerca de 12 millones de personas se encuentran en riesgo en las áreas endémicas, aunque entre el 2000 y el 2016 se observó una reducción de alrededor del 40 % en la morbilidad por malaria (13,14).

El dengue es la enfermedad viral de más rápida expansión mundial y su incidencia aumentó unas 30 veces en los últimos 50 años. Se estima que cerca de 3.900 millones de personas viven en zonas donde hay riesgo de contraer el dengue en los 128 países endémicos del mundo. Se calcula que ocurren unas 390 millones de infecciones (96 millones de ellas sintomáticas) y 20.000 muertes por dengue al año en zonas urbanas. En 2016, se reportaron en las Américas 2'249.842 casos de dengue y 947 muertes (15-17). Al finalizar el 2016, se registraron en el país 103.822 casos de dengue y 60 muertes confirmadas por esta causa (18).

El virus del chikungunya se aisló por primera vez entre 1952 y 1953, durante una epidemia en Tanzania, y su nombre proviene de la palabra en lengua makonde que significa "aquel que se encorva" (19). Posteriormente, ocurrieron brotes en pequeñas comunidades rurales y dispersas en África y Asia. En las décadas de los 60 y 70, se aislaron cepas en Bangkok, Tailandia y Calcuta (India) (20,21). En 2004, se diseminó a las islas Comoros, Reunión y otras del Pacífico (22). En el 2013, se reportaron los primeros casos de chikungunya adquiridos localmente en las Américas y en las islas del Caribe. Hasta marzo del 2014, se habían reportado15.000 casos sospechosos (23). En junio de 2014, apareció en la República Dominicana donde se notificaron más de 600.000 casos sospechosos.

Correspondencia:
Julio César Padilla, Programa de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Ministerio de Salud y Protección Social, Carrera 13 N° 32-76, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfonos: (571) 330 5000, extensiones 1459, 1094 y 1095; (320) 293 9498
jcpadillar59@gmail.com y jcpadilla59@yahoo.es

Recibido: 31/12/16; aceptado: 27/09/17

Desde ese momento, se produjo una amplia expansión a los países vecinos de Centroamérica (Costa Rica, El Salvador y Panamá), así como a países del área andina, como Venezuela y Colombia (24). En el país se detectó el inicio de la transmisión autóctona del virus del chikungunya en Mahates, en el distrito de Cartagena, y en San Juan Nepomuceno, en el norte del departamento de Bolívar (25).

El Zika tomó su nombre del bosque ubicado en Uganda donde se aisló por primera vez el virus en 1947. Desde el 2015 y finales del 2016, 48 países y territorios de las Américas confirmaron casos autóctonos por transmisión vectorial del virus del Zika y cinco países notificaron casos transmitidos sexualmente. Además, 22 países y territorios de las Américas notificaron casos confirmados del síndrome congénito asociado a la infección por el virus del Zika (26). En Colombia, desde el inicio de la fase endémica del Zika, a partir de la semana epidemiológica 29 y hasta la semana epidemiológica 52 de 2016, se notificaron 4.834 casos producidos por este arbovirus emergente (27).

Se estima que la prevalencia de las leishmaniasis a nivel mundial es de 20 millones de casos y que la incidencia anual oscila entre 1,5 y 2 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea y 500.000 de leishmaniasis visceral en zonas de transmisión rural. Entre el 2001 y el 2014, en 17 de los 18 países endémicos de la región de las Américas, se reportaron 797.849 casos nuevos de leishmaniasis cutánea y mucosa, para un promedio anual de 56.989 casos distribuidos, con tendencia estable (28). Hasta mediados de la primera década del presente milenio, se registraba en Colombia un promedio de 6.000 casos anuales, pero a partir de ese momento se produjo un incremento de 100 % en la endemia, que se mantiene hasta la fecha y genera anualmente unos 12.000 casos anuales de leishmaniasis desde el 2005 (29).

La tripanosomiasis americana, o enfermedad de Chagas, transmitida por vectores es una condición endémica en 21 países de las Américas. En la región, se estima que entre 65 y 100 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad. Aunque es endémica en las Américas, la migración de personas infectadas puede llevarla a países no endémicos de este continente y del mundo (30,31). Se estima que la población en riesgo de enfermedad de Chagas en Colombia es de 4’813.543, la prevalencia es de 9,5 por 1.000 habitantes, el número de infectados es de 437.960; asimismo, se han registrado cerca de 131.388 casos de cardiopatía chagásica y la prevalencia en donantes es de 0,41 % (30,31).

En el presente estudio se propuso establecer la magnitud e importancia epidemiológica del problema de las enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, así como determinar el comportamiento epidemiológico de las principales de ellas en zonas urbanas y rurales entre 1990 y 2016.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo sobre el comportamiento general de las principales enfermedades transmitidas por vectores en ámbitos epidemiológicos urbanos y rurales en Colombia durante el periodo comprendido entre 1990 y 2016. El universo de estudio comprendió la totalidad de los casos de dengue, chikungunya, Zika, malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas registrados en el Sivigila en el lapso de 1990 a 2016.

Las variables analizadas para el estudio de la morbilidad y la mortalidad fueron los casos y las muertes debidas a estas enfermedades, la población en riesgo en zonas urbanas, rurales y en el territorio nacional; las variables de lugar incluyeron las zonas urbanas, rurales y el territorio nacional, y las variables de tiempo fueron los periodos anuales entre 1990 y 2016 para malaria, leishmaniasis y dengue, los periodos anuales entre 2008 y 2016 para la enfermedad de Chagas, los periodos epidemiológicos entre 2014 y 2016 para chikungunya y el periodo epidemiológico de 2015 a 2016 para la fiebre de Zika.

Utilizando la información oficial del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), se tomaron como denominadores las proyecciones anuales de las poblaciones urbanas en riesgo de arbovirosis y las rurales en riesgo de malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas, en los correspondientes periodos estudiados.

Se asumieron las definiciones oficiales de casos establecidas en el Sivigila y las definiciones de mortalidad recomendadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para estas enfermedades y las utilizadas internacionalmente y en el país. Se consideró como caso de malaria urbana o periurbana aquel caso confirmado en un área urbana o periurbana (definida según los planes oficiales de ordenamiento municipal) en el que se hubiera demostrado el origen autóctono de la transmisión (32).

A partir de las bases de datos generales de morbilidad de las enfermedades en estudio disponibles en el Sistema Integral de Información de la Protección Social (Sispro), se elaboró una base para la recolección, tabulación y análisis de las variables de estudio. Para su análisis, se construyeron medidas de frecuencia absoluta, como el número de casos totales anuales de cada enfermedad, y medidas de frecuencia relativas, como porcentajes y proporciones de incidencia, utilizando para todas las enfermedades la constante de 100.000 habitantes para medir la morbilidad y la mortalidad. Además, se utilizaron estadísticas de resumen, medianas de las tasas de incidencia y media aritmética.

Con la información disponible de los casos por municipio durante los periodos estudiados, se estableció el número de municipios que concentraba el 80 % de la carga acumulada de casos, con el fin de determinar el número de municipios o focos persistentes de transmisión endemoepidémica, según la metodología recomendada en la "Guía oficial para la gestión de la vigilancia entomológica y control vectorial de *Aedes aegypti*" del Ministerio de Salud y Protección Social y el Instituto Nacional de Salud.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las series anuales de los datos fluctuaban, y que el comportamiento de las enfermedades era irregular dada su naturaleza endemoepidémica característica, se utilizó una línea de tendencia polinómica para determinar el comportamiento secular de la morbilidad por dengue, malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas.

El estudio tuvo en cuenta los requisitos éticos establecidos en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, cuyo artículo 11 establece que estudios como el presente son investigaciones sin riesgo (33).e

Resultados

En los últimos veintisiete años (1990-2016), se registraron en el país 5.360.134 casos de enfermedades transmitidas por vectores, de los cuales el 54,7 % (3'079.472) eran de malaria y, el 24,9 % (1'401.240), de dengue; estas dos enfermedades concentraron el 80 % de la distribución porcentual de los todos los casos de enfermedades transmitidas por vectores. La población en riesgo de adquirir alguna de estas enfermedades en Colombia es de 40 millones de personas, aproximadamente. Además, se han reportado 774.831 casos de chikungunya desde su introducción en el 2014 y hasta finales de 2016, en tanto que se han notificado 117.674 casos de fiebre de Zika desde su aparición en el 2015. En este lapso se registraron 3.240 muertes por enfermedades transmitidas por vectores, 58 % (1.891) de ellas debidas a la malaria (cuadro 1).

Zonas urbanas

Las arbovirosis endemoepidémicas transmitidas por *A. aegypti*, como el dengue, y las emergentes como el chikungunya y el Zika, se presentan predominantemente en las zonas urbanas del país situadas a menos de 2.200 msnm, en las cuales alrededor de 28'344.991 personas se encuentran en riesgo de verse afectadas por ellas. Entre 1990 y 2016, se registraron oficialmente en el país 1.401.240 casos de dengue por transmisión endemoepidémica. Entre 2010 y 2016, se registró el 48,1 % (n=674.043) de los casos notificados en el lapso de 1990 a 2016. En la década del 2000 al 2009, se registró un aumento de 1,7 veces en los niveles endémicos de la enfermedad y de 2,5 veces entre 2010 y 2016, comparados con el periodo de 1990 a 1999. La mediana de las tasas de incidencia de dengue observada en el lapso fue de 188,1 por 100.000 habitantes (cuadro 1).

Cuadro 1. Morbilidad y mortalidad por enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016

Tipo de evento	Población en riesgo en 2016	Número de casos por periodo			Municipios endémicos			Carga acumulada de casos		Proporción de la incidencia por 100.000[a]	Número de muertes
		1990-1999	2000-2009	2010-2016	N°	Focos	Casos en zona urbana	Total	%		
Malaria	12'000.000	1'478.847	1'127.080	473.545	635	59	132.296[b]	3'078.968	54,7	1.371	1.891
Leishmaniasis	11'000.000	58.895	116.291	74.559	721	12	SD	181.344	4,4	81	10
Enfermedad de Chagas	4'850.000	0	0	7.172	109	5	SD	7.172	0,1	11	14[c]
Dengue	28'344.991	272.360	454.837	674.043	909	188	1'401.240	1'401.240	24,9	188	1.181
Chikungunya	28'344.991	0	0	774.831	758	40	774.831	774.831	13,8	396,6	94
Zika	28'344.991	0	0	117.674	758	90	117.674	117.674	2,1	195	0
		1'810.102	1'698.208	2'121.824			2'426.041	5'561.229			

[a] Mediana de la tasa de incidencia en el periodo 1990-2016; [b] Casos de malaria urbana reportados entre 2008 y 2016; [c] Casos agudos de enfermedad de Chagas. Fuentes: Informe epidemiológico de evento, Instituto Nacional de Salud; Sistema Integral de Información de la Protección Social - SISPRO

El comportamiento secular de la morbilidad por dengue en Colombia entre 1990 y 2016 evidenció una progresiva tendencia ascendente, más acentuada a partir de 2010 pero con un coeficiente de determinación (R^2) que explica el 36 % de ella. Su comportamiento en ese lapso se caracterizó por un aumento paulatino de la endemia en las diferentes décadas (cuadro 1), la aparición de ciclos epidémicos cada tres a cuatro años, y el incremento de su intensidad y duración en los últimos años (figura 1).

Al finalizar la primera década del presente milenio se observó que 80 % de los casos acumulados de dengue durante ese lapso se concentraron en 90 (9,5 %) de los 909 endémicos que notifican casos al Sivigila en el país. A su vez, entre el 2010 y el 2016, el 80 % de casos acumulados se concentró en 120 municipios (12,6 %) de todos los municipios en riesgo. Entre el 1990 y el 2016, se reportaron 1.181 muertes por dengue en Colombia (cuadro 1).

En el 2014, específicamente a partir de la semana 36, comenzó la transmisión del virus del chikungunya en el territorio nacional. Desde su ingreso al país hasta la semana 52 del año 2016, se registraron 774.831 casos y un total de 94 muertes confirmadas por esta causa. La mediana de la tasa de incidencia fue de 396,6 por 100.000 habitantes (cuadro 1). A comienzos de 2015, alcanzó el acmé de la fase expansiva e intensificada de la epidemia. La curva observada correspondió a la de una epidemia de fuente propagada. En la semana 30 de 2015 terminó la etapa posterior a la fase expansiva de la epidemia y se inició la transmisión endémica de la enfermedad en el territorio nacional (figura 2). Hasta la semana epidemiológica 50 del 2016, se registraron 19.496 casos y ocho muertes confirmadas por chikungunya en el país (cuadro 1).

Desde su aparición en Colombia, en el 2015, se notificaron oficialmente 117.674 casos de Zika y la mediana de la tasa de incidencia fue de 195 por 100.000 habitantes (cuadro 1). A partir de la semana epidemiológica 32 del 2015, se produjo la introducción del virus en áreas infestadas por el vector *A. aegypti* en el territorio nacional. La transmisión emergente se inició en la semana 38, con la fase ascendente de la onda expansiva del brote, y alcanzó el acmé en la semana 4 de 2016. En la siguiente semana se inició la fase descendente de la epidemia hasta la semana 28 de ese año. Finalmente, la fase endémica de la enfermedad se inició en la semana epidemiológica 29 de 2016. La curva observada fue la de una epidemia de fuente propagada (figura 3).

Entre el 2008 y el 2016 se registraron en el Sivigila 132.296 casos clasificados como malaria o paludismo urbano o periurbano, es decir, un promedio de 14.700 casos anuales en el periodo, equivalente a 21 % del total de casos registrados durante ese periodo (cuadro 1).

Zonas rurales

En cuanto a las zonas rurales de Colombia, las enfermedades endemoepidémicas transmitidas por vectores que predominan son las parasitarias, como la malaria, las leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, con cerca de 12 millones de personas en riesgo de verse afectadas por estas enfermedades (cuadro 1).

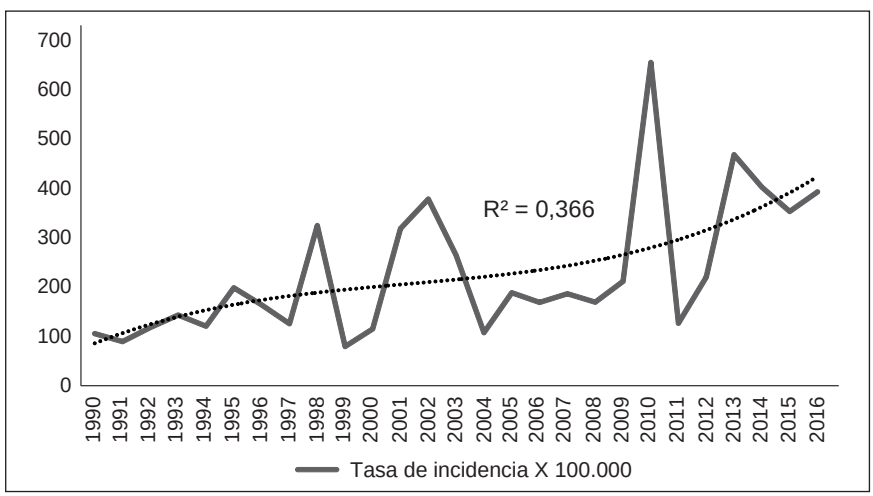


Figura 1. Comportamiento secular del dengue en Colombia, 1990-2016
Fuente: Sistema Integral de Información de la Protección Social – SISPRO

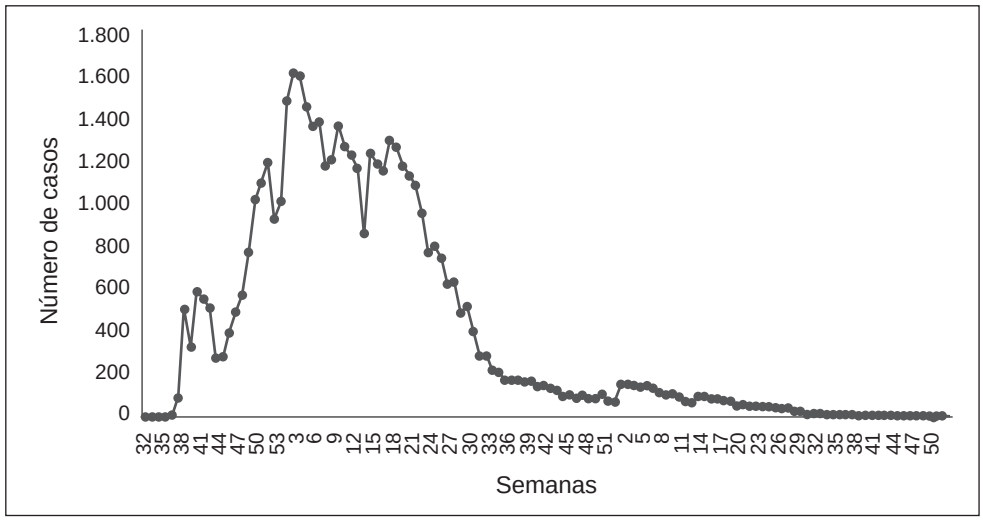


Figura 2. Comportamiento de la transmisión emergente del chikungunya en Colombia, 2014-2016
Fuente: Sistema Integral de Información de la Protección Social – SISPRO

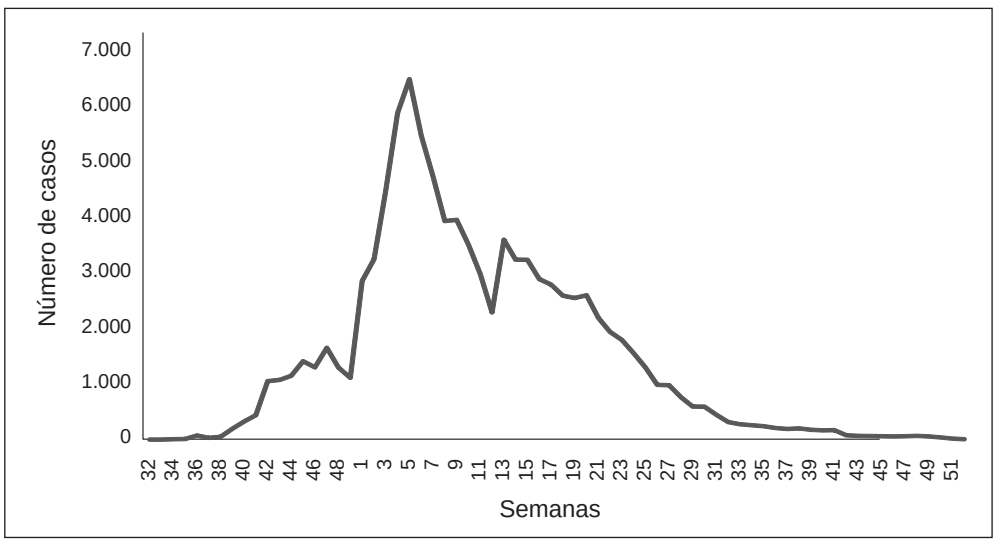


Figura 3. Comportamiento de la transmisión de la fiebre del Zika en Colombia, 2015-2016
Fuente: Sistema Integral de Información de la Protección Social – SISPRO

En el periodo entre 1990 y 2016, el comportamiento secular de la morbilidad por malaria en Colombia mostró una acentuada tendencia descendente, y la aparición de brotes epidémicos estacionales irregulares e intensos en los años 1991 a 1992, 1995, 1998, 2007, 2010 y 2015 a 2016. El R^2 registrado explicó el 75 % de la tendencia (figura 4). En este periodo, se registraron 3.079.472 casos de malaria en el país, es decir, un promedio de 114.036 al año. La mediana observada de las tasas de incidencia fue de 1.371 por 100.000 habitantes (cuadro 1). Durante la década de 1990, se registró la mayor cantidad de casos de malaria reportados en los últimos 27 años (1.478.847; 48 %), seguido del periodo entre 2000 y 2009, cuando se registraron 1.127.080 (36,6%). El 80 % de la transmisión focal persistente de malaria en el país se concentró en 59 municipios endémicos con transmisión activa. Las muertes por malaria reportadas en el periodo entre 1990 y 2016 fueron 1.891 (cuadro 1).

Entre 1990 y 2016, se registraron 249.745 casos de leishmaniasis en las áreas endémicas del país. En la década de los noventa, se registraron 58.895 (23,6 %) casos; entre el 2000 y el 2009, se reportaron 116.291 (64,7 %), y entre el 2010

y el 2016, se notificaron 107.349 (43 %) casos confirmados de leishmaniasis, con una mediana de la tasa de incidencia de 81 por 100.000 habitantes (cuadro 1). En general, la tendencia de la morbilidad por las leishmaniasis entre el 2000 y el 2016 mostró un comportamiento epidemiológico ascendente hasta mediados de la primera década de este siglo, seguido de un periodo de transmisión endémica estable. El R^2 registrado en el periodo explicó el 55 % de la morbilidad (figura 5). En el lapso de tiempo estudiado fallecieron 10 pacientes por leishmaniasis visceral, lo cual representó una letalidad de 1,5 % (cuadro 1).

Entre el 2008 y el 2016, se registraron en el país 7.172 casos de enfermedad de Chagas, con una mediana de la tasa de incidencia de 11 por 100.000 habitantes, y se registraron cuatro muertes por (cuadro 1). Se observó una tendencia estable en el comportamiento de la morbilidad debida a la enfermedad en el periodo entre el 2008 y el 2016. El R^2 observado fue de 0,06 (figura 6).

Discusión

Los resultados obtenidos evidencian la magnitud y la importancia de las principales enfermedades transmitidas por vectores, lo que las convierte en un problema prioritario de salud pública en zonas tanto rurales como urbanas. Desde el punto de vista epidemiológico, dichas enfermedades tienen en común su comportamiento endemoepidémico persistente y focalizado, aunque con una amplia dispersión y patrones variables de intensidad de la

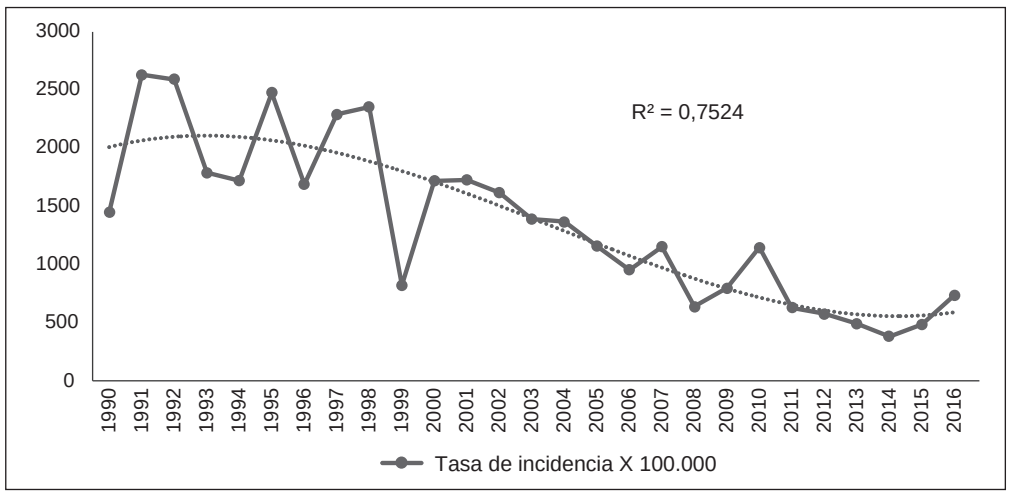


Figura 4. Comportamiento de la morbilidad por malaria en Colombia, 1990-2016
Fuente: Sistema Integral de Información de la Protección Social – SISPRO

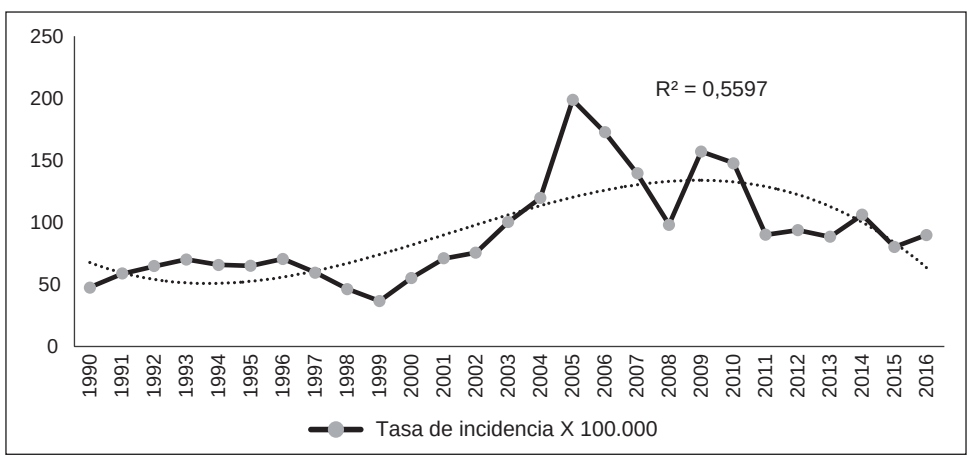


Figura 5. Comportamiento secular de la leishmaniasis en Colombia, 1990-2016
Fuente: Sistema Integral de Información de la Protección Social – SISPRO

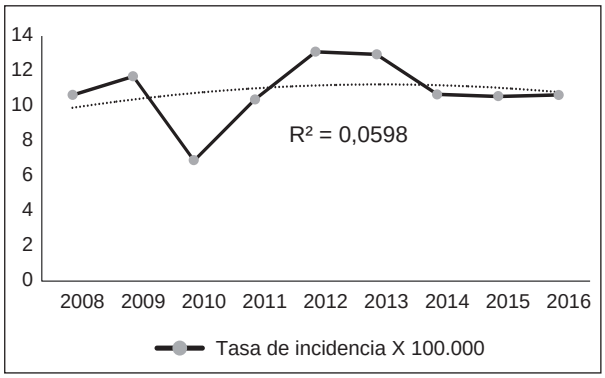


Figura 6. Comportamiento de la enfermedad de Chagas en Colombia, 2008-2016.
Fuente: Sistema Integral de Información de la Protección Social – SISPRO

transmisión en las áreas endémicas del territorio nacional. Además, la gran receptividad en las zonas urbanas ha favorecido la aparición de nuevas arbovirosis, como el chikungunya y el Zika.

La malaria se destacó como la enfermedad de mayor contribución proporcional a la morbilidad general debida a las enfermedades transmitidas por vectores en las últimas tres décadas en el país. Este hallazgo difiere de lo observado en el resto de la región de las Américas, donde la mayor proporción de casos de enfermedades transmitidas por vectores se debió al dengue (34). El aporte de las arbovirosis emergentes, como el chikungunya y el Zika, fue muy similar en los países de esta región (35,36).

La disminución de la transmisión de la malaria observada en las zonas rurales endémicas del país coincide con la reducción registrada en el mismo periodo en toda la región de las Américas, en donde se redujo en más del 60 % en el periodo entre el 2000 y el 2015. La disminución sostenida de la transmisión superior a 75 % se ha registrado en Paraguay, Ecuador, Costa Rica, Argentina, El Salvador, Belice, Surinam, Nicaragua, Guatemala, Honduras y Bolivia, en tanto que en Colombia, República Dominicana y Brasil, dicha reducción ha estado entre el 75 y el 50 % (37). Asimismo, la disminución de la mortalidad por malaria registrada en Colombia coincide con lo observado en la región, donde las reducciones han sido de más del 70 % (38). Entre los factores que han contribuido a la reducción de la morbilidad y la mortalidad deben señalarse el mejor acceso al diagnóstico y al tratamiento oportuno con nuevos esquemas antipalúdicos basados en derivados de las artemisininas, las coberturas de prevención alcanzadas con los toldillos con insecticidas de larga duración, el manejo integrado de vectores, la movilización y la comunicación social (39,40).

A pesar de los avances alcanzados en la reducción de la transmisión endémica de malaria, frecuentemente se registran brotes estacionales debido al deterioro ambiental que facilita la reproducción de vectores anofelinos y a la gran migración de población vulnerable portadora de parásitos causada por la intensificación de las actividades de minería ilegal y la proliferación de cultivos ilícitos en áreas endémicas inestables y de poca transmisión, como ocurre en Venezuela, Perú y Brasil (41). Además, la intensa migración de poblaciones entre las áreas con transmisión activa y los centros urbanos cercanos a los enclaves mineros ha facilitado la transmisión autóctona y residual en la periferia de las ciudades situadas en medio de la selva (42). Sin embargo, la información disponible sobre la transmisión urbana o periurbana autóctona tiene problemas de confiabilidad y calidad debidos, entre otras razones, a una mala configuración y clasificación según la procedencia de los casos que ingresan al sistema. No obstante, el hallazgo de personas asintomáticas con infección submicroscópica en la periferia de ciudades de la costa Pacífica colombiana, podría llevar a pensar en la existencia de pequeños focos residuales activos de malaria de baja transmisión (42,43).

A su vez, desde la reaparición de la transmisión del dengue en la región de las Américas en la década de los setenta, ha habido una progresiva intensificación y expansión de la transmisión en áreas infestadas por *A. aegypti*, como ha sucedido en nuestro país. Además, en las mismas condiciones se observa una creciente expansión de arbovirosis emergentes, como el chikungunya y el Zika (44). Según la OPS y la OMS, durante el periodo estudiado se pudo evidenciar que el dengue ha crecido más de 19 veces en toda el área endémica del continente americano infestada por *A. aegypti*, donde, exceptuando Canadá y Chile, cerca de 500 millones de personas se encuentran en riesgo (45,46).

Los factores que más han contribuido a la situación son la gran concentración poblacional en las principales ciudades capitales e intermedias, la urbanización no planificada, las deficiencias en la prestación de servicios básicos, los problemas de saneamiento de los entornos domiciliarios, escolares, laborales y de establecimientos especiales, y la falta de voluntad y compromiso político de las autoridades institucionales y los estamentos sociales involucrados en el problema (47,48).

A su vez, los factores que más han contribuido al mantenimiento y a la persistencia de la transmisión endémica del dengue, son el almacenamiento inadecuado y prolongado de agua para consumo humano, una percepción errónea de la responsabilidad individual, colectiva, institucional y social frente al problema, y las acentuadas desigualdades sociales (49). Además, la interconexión regional y la mayor frecuencia e intensificación de los intercambios comerciales y los viajes aéreos, han favorecido la diseminación, la introducción y los intercambios de diferentes serotipos por el rápido tránsito de individuos con viremia en toda la región (50,51).

La introducción, propagación y expansión de nuevas arbovirosis, como el chikungunya y el Zika, tuvieron un gran impacto en la población de la mayor parte del territorio infestado por *A. aegypti.* Recientemente, estas infecciones iniciaron la fase endémica y actualmente se superponen con la transmisión persistente del dengue (52,53). Las condiciones que probablemente contribuyeron y facilitaron la introducción y la aparición de estos virus están muy ligadas a factores externos regionales y globales. Entre los más importantes se destacan la intensificación del desplazamiento de poblaciones sensibles portadoras de virus provenientes de países con transmisión epidémica hacia zonas urbanas muy receptivas debido a la persistencia de los riesgos ambientales, y la gran vulnerabilidad de toda la población por la ausencia de contacto con tales virus emergentes (54,55).

Asimismo, deben destacarse los efectos potenciales del cambio climático, como el desplazamiento de la distribución de las poblaciones de mosquitos y su mayor supervivencia en altitudes más elevadas, la modificación de la frecuencia de picadura, la supervivencia y la reducción o aumento del periodo de incubación externo, lo cual aumenta la tasa de replicación vírica en el mosquito (56,57).

El comportamiento estable de la transmisión de las leishmaniasis en los últimos años en el país es el resultado de la dinámica de la incursión militar durante las acciones de contrainsurgencia y contra los cultivos ilícitos llevadas a cabo en focos enzoóticos selváticos, así como del desplazamiento de los integrantes de los grupos ilegales a zonas rurales receptivas (58,59). Con la desmovilización de los grupos armados y la reducción de las operaciones militares en áreas endémicas como consecuencia de los acuerdos de paz, se espera una reducción de la enfermedad en los próximos años (60,61). En los países endémicos de leishmaniasis en las Américas, aunque se observa una tendencia regional estable, el análisis por periodos evidencia un incremento de casos hasta el año 2005, ocasionado por el aumento del registro de casos en Colombia y Perú, países de la subregión andina (62,63).

La enfermedad de Chagas en las áreas endémicas del territorio nacional ha mantenido una tendencia estable y patrones variables y focales de transmisión, que han fluctuado de la hipoendemia a la hiperendemia. En este sentido, debe considerarse que en diversos estudios de seroprevalencia de la enfermedad de Chagas realizados en los últimos años en poblaciones indígenas de la Sierra Nevada de Santa Marta y en los Llanos Orientales, se han registrado prevalencias elevadas de infección por *Trypanosoma cruzi*, incluida la transmisión congénita, que sugieren perfiles de transmisión mesoendémicos e hiperendémicos en estas poblaciones (59,60-62).

Cerca del 98 % de los casos reportados han sido crónicos y el resto agudos, debidos, principalmente, a la transmisión oral (63). En este sentido, los casos agudos reportados en Chocó, Sucre y Córdoba sugieren la aparición de nuevas zonas de transmisión con gran vulnerabilidad debido a la presencia de poblaciones desplazadas (64,65). Asimismo, el reporte reciente de brotes de enfermedad aguda de Chagas por transmisión oral en Casanare, Cesar, Chocó y Santander, demuestra la importancia de esta forma de transmisión en el país.

La aparición de los casos crónicos se podría explicar, entre otros aspectos, por su inclusión en el sistema de vigilancia pasiva desde el 2008, y por las dificultades para detectar y confirmar las formas clínicas más frecuentes de la enfermedad, como en los casos crónicos latentes asintomáticos (63). Estos casos demandan poca atención en los servicios de salud o pasan desapercibidos, por lo cual no se notifican, y tampoco se hace la notificación regular de los casos de cardiopatía chagásica detectados por instituciones especializadas y centros de investigación científica; además, falta coordinación y no es obligatorio notificar los casos reactivos sospechosos de enfermedad de Chagas captados durante las actividades de vigilancia de la sangre y sus componentes, lo cual debería hacerse a pesar de su baja frecuencia (0,4 % de seropositividad); también, existe un subregistro de síndromes de muerte súbita y de situaciones relacionadas (Restrepo-Isaza M, Parra GJ, Restrepo CA. Morbilidad de la enfermedad de Chagas en

la Sierra Nevada de Santa Marta, 2000. Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES. Informe al Ministerio de Salud). Además, la reducción observada de casos puede ser el resultado de las acciones de control en algunas zonas donde se viene implementando el plan de eliminación de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en municipios prioritarios (66-70).

En general, la persistencia, la aparición y la reaparición de las principales enfermedades transmitidas por vectores son el resultado de una compleja, intensa y dinámica interacción de procesos sociales, económicos, políticos, culturales y biológicos que genera diversos niveles de vulnerabilidad y receptividad en las zonas de transmisión y determina el tipo y el patrón de transmisión de cada una de estas enfermedades en el territorio nacional. Además, en las zonas urbanas se mantiene un gran potencial de transmisión que ha facilitado la introducción y la aparición de nuevas arbovirosis transmitidas por el mismo vector (71-73).

Hubo en el estudio algunas limitaciones relacionadas con la confiabilidad, la calidad y la oportunidad de la información, propias de los sistemas de vigilancia pasiva, lo cual puede llevar a subestimar la magnitud real de las enfermedades transmitidas por vectores, sobre todo las arbovirosis. Asimismo, el hecho de que la gran mayoría de casos notificados no se confirman por laboratorio, y que su presentación clínica es similar, o pueden presentarse concomitantemente con otras enfermedades transmisibles prevalentes en las mismas zonas, también genera dudas sobre la confiabilidad de la información.

La información comprobada contribuye a fortalecer el proceso de adopción de decisiones para optimizar el uso de los recursos y las herramientas de intervención disponibles para un manejo integrado y sostenible de los vectores, promoviendo aquellas intervenciones que, por separado o combinadas, respondan al conocimiento local sobre los vectores, al tipo de enfermedades prevalentes y a sus factores determinantes, y recurran a los sistemas existentes y a los recursos humanos locales para una mayor eficacia, costo-eficiencia y sostenibilidad ecológica. Estas deben ser las herramientas operativas que garanticen la implementación y sostenibilidad de la estrategia de gestión integral de las enfermedades transmitidas por vectores con la participación de todos los sectores sociales e institucionales responsables, para lograr un impacto efectivo en las diferentes formas de transmisión de estas enfermedades a mediano y a largo plazo (74).

En este contexto, se plantean los siguientes retos. Es necesario priorizar y consolidar cuanto antes un proceso de fortalecimiento institucional y de mejoramiento de la capacidad de respuesta técnico-operativa en los niveles locales, especialmente, en aquellos municipios que concentran la mayor carga acumulada de casos y en donde persiste la transmisión endemoepidémica de dengue, además de presentar las condiciones propicias para la aparición y reaparición de otras arbovirosis. Se deben establecer programas regulares y sostenibles fundamentados en el desarrollo y la consolidación de la promoción y la prevención, con énfasis en estrategias de manejo integrado de entornos y de vectores (75).

Se deben mejorar los procesos conducentes a consolidar el manejo integral de los casos de malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas, e intensificar las acciones para garantizar la eliminación de la malaria en áreas urbanas e hipoendémicas en el 2021, así como implementar planes para la eliminación de la transmisión de la leishmaniasis visceral y de los focos de leishmaniasis cutánea en zonas de transmisión concentrada. Con relación a la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, debe continuarse el proceso de certificación de la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *Rhodnius prolixus* que se desarrolla en los municipios de mayor riesgo en el país, según las metas del Plan Decenal de Salud Pública (76).

Los mayores retos se concentran en dar regularidad al trabajo intersectorial, con el fin de enfrentar los factores estructurales e intermedios determinantes del problema e incidir a largo plazo y en forma sostenida en la carga de estas enfermedades en el marco de las garantías del derecho fundamental a la salud de la población en riesgo y de los afectados por las enfermedades de transmisión vectorial, mediante la implementación del “Modelo integral de atención en salud” y sus correspondientes “Rutas integrales de atención en salud”.

En conclusión, el presente trabajo permitió evidenciar la importancia de estas enfermedades en las zonas urbanas y rurales en Colombia. Cada una de ellas presenta diferentes patrones de transmisión que incluyen la endemia y la epidemia persistentes, focalizadas, de gran dispersión y de variable intensidad. Asimismo, en las zonas urbanas se mantienen las condiciones que favorecen la transmisión endemoepidémica persistente del dengue y la transmisión emergente de otras arbovirosis,

lo que requiere de acciones sostenibles contra los factores estructurales determinantes a partir de la promoción y la prevención rutinarias.

Agradecimientos

A todos los gerentes responsables de liderar los programas departamentales de prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores que facilitaron y complementaron la información epidemiológica utilizada para este artículo.

Conflictos de intereses

Los autores manifiestan no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Financiación

El artículo no contó con ninguna fuente de financiación para su elaboración.

Referencias

1. **Gil de Miguel A, Álvarez-Martín E, Valcacer-Rivera Y, Esteban-Hernández J.** Enfermedades transmitidas por artrópodos: paludismo, fiebre amarilla, dengue. En: Gil P, editor. Medicina Preventiva y Salud Pública. Barcelona: Elsevier Masson; 2008. p. 758-9.
2. **Verwoerd DW.** Definition of a vector and a vector-borne disease. Rev Sci Tech. 2015;34:37-9.
3. **Maclachlan NJ, Mayo CE, Daniels PW, Gibbs EP.** Bluetongue. Rev Sci Tech. 2015;34:329-40.
4. **Zientara S, Verwoerd DW, Pastoret PP.** New developments in major vector-borne diseases. Rev SciTech. 2015;34:17-27.
5. **Kock RA.** Vertebrate reservoirs and secondary epidemiological cycles of vector-borne diseases. Rev Sci Tech. 2015;34:151-63.
6. **Santos M.** La naturaleza del espacio. Técnica y tiempo. Razón y emoción. Barcelona: Ed. Ariel Geografía, S.A.; 2000. p. 352.
7. **Rodhain F.** Les insects comme vecteurs: systématique et biologie. Rev Sci Tech. 2015;34:67-82.
8. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de malaria. Junio de 2011. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Documentacin%20Malaria/03%20Vigilancia%20entomo%20malaria%20.pdf.
9. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue. Junio de 2011. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Dengue/03%20Vigilancia%20entomo%20dengue.pdf.
10. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis. Junio de 2011. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Leishmaniasis%20viceral/03%20Vigilancia%20Entomo%20Leishmaniasis.pdf.
11. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Instrumento para el diagnóstico y la atención de pacientes con sospecha de Arbovirosis. Washington, D.C.: OPS; 2016. p. 100.
12. **Organización Mundial de la Salud.** Enfermedades transmitidas por vectores. Nota descriptiva N° 387, febrero de 2016. Geneva: WHO; 2016. Fecha de consulta: 15 enero de 2016. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/.
13. **Keiser J, Singer BH, Utzinger J.** Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: A systematic review. Lancet Infect Dis. 2005;5:695-708. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70268-1
14. **Organización Mundial de la Salud.** Informe mundial sobre el paludismo, 2015. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2016. Disponible en: www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/es/.
15. **Organización Mundial de la Salud.** Objetivos de desarrollo del milenio. Nota Nº 290, mayo de 2015. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs290/es/.
16. **Organización Mundial de la Salud.** Dengue: prevención y control. Informe de la Secretaría. Consejo Ejecutivo 136ª reunión. EB 136/24, 21 noviembre de 2014. Ginebra: OMS; 2014.
17. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud**. Dengue: datos estadísticos y epidemiología. Descripción de la situación epidemiológica en las Américas. Fecha de consulta: 1° de febrero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=es.
18. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico, semana 52 de 2016: Dengue. Fecha de consulta: 1° de febrero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf.
19. **Lumsden WH.** An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1953-54: General description and epidemiology. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1955;49:33-57.
20. **Shah KV, Gibbs CJ Jr, Banerjee G.** Virological investigation of the epidemic of haemorrhagic fever in Calcuta: Isolation of three strains of chikungunya virus. Indian J Med Res. 1964;52:676-83.
21. **Thaikruea L, Charearnsook O, Reanphumkarnkit S, Dissomboon P, Phonjan R, Ratchbud S, *et al*.** Chikungunya in Thailand: A re-emerging disease? Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997;28:359-64.
22. **Borgherini G, Poubeau P, Staikowsky F, Lory M, Le Moullec N, Becquart JP, *et al*.** Outbreak of chikungunya on Reunion Island: Early clinical and laboratory features in 157 adult patients. Clin Infect Dis. 2007;44:1401-7. https://doi.org/10.1086/517537

23. **Cassadou S, Boucau S, Petit-Sinturel M, Huc P, Leparc-Goffart I, Ledrans M.** Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. Euro Surveill. 2014;19:pii=20752. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20752

24. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Chikungunya: datos, mapas y estadísticas OPS/OMS. Número de casos reportados de Chikungunya en las Américas, semana 52 de 2016. Fecha de consulta: 1° de febrero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8380&Itemid=40931&lang=es.

25. **Campo A, Martínez M, Benavidez M, Cuéllar N.** Brote de Chikungunya en el municipio de San Juan Nepomuceno, Bolívar, Colombia 2014. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2015;1: 2-20.

26. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Virus del Zika – Incidencia y tendencia. Washington, D.C.: OPS/OMS; 2016.

27. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico, semana 52 de 2016: Zika. Fecha de consulta: 10 de enero de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052.pdf.

28. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Leishmaniasis: informe epidemiológico de las Américas en 2016. Fecha de consulta: 6 de enero de 2016. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=6722&Itemid=40754&lang=es.

29. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento leishmaniasis, séptimo periodo epidemiológico, Colombia, 2016. Fecha de consulta: 10 de enero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/LEISHMANIASIS%20Periodo%20VI%202016.pdf.

30. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Enfermedad de Chagas. Washington, D.C.: OPS/OMS; 2017.

31. **World Health Organization.** Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly Epidemiological Record. 2015;90:33-44. Fecha de consulta: 6 de enero de 2017. Disponible en: http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf

32. **Padilla JC, Chaparro PE, Molina K, Arévalo-Herrera M, Herrera S.** Is there malaria transmission in urban settings in Colombia? Malar J. 2015;14:453. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0956-0

33. **Ministerio de Salud.** Resolución 008430 de 1993. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Fecha de consulta: 30 enero de 2017. Disponible en: http://www.urosario.edu.co/EMCS/Documentos/investigacion/resolucion_008430_1993/.

34. **Fernández-Salas I, Díaz-Gonzáles EE, López-Gatell H, Alpuche-Aranda C.** Chikungunya and zika virus dissemination in the Americas: Different arboviruses reflecting the same spreading routes and poor vector-control policies. Curr Opin Infect Dis. 2016;29:467-75. https://doi.org/10.1097/OCO.0000000000000304

35. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Extensión geográfica del chikungunya en las Américas 2013-2017. Fecha de consulta: 1° de febrero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5932&Itemid=40931&lang=es.

36. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Zika – Actualización epidemiológica regional de la OPS (Américas), 26 julio de 2017. Fecha de consulta: 15 de enero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691&lang=es.

37. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Informe de situación del paludismo en las Américas 2015. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=8110&Itemid=40757&lang=es.

38. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Situación de la malaria en la región de las Américas, 2000-2013. Fecha de consulta: 12 enero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=8110&Itemid=40757&lang=es.

39. **Proyecto Malaria Colombia.** Objetivo 2: implementar la protección mediante el uso generalizado de mosquiteros insecticidas de larga duración (MILD) en la población vulnerable objeto de la intervención. En: Logros, retos y lecciones aprendidas. Bogotá: Fondo Financiero de Proyectos de Desarrollo (FONADE), Instituto Nacional de Salud (INS), Fundación Universidad de Antioquia (FUA). Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Memorias%20Malaria/2.Libro%20Logros%20Retos%20y%20Lecciones%20Aprendidas%20PMC.pdf.

40. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Informe de logros ODM: malaria y dengue, 2014. Subdirección de Enfermedades Transmisibles, Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2016. p. 26.

41. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Informe de epidemias de malaria 2016. Subdirección de Enfermedades Transmisibles. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2016. p. 15.

42. **World Health Organization.** Malaria epidemics: Detection and control forecasting and prevention. Geneva: WHO; 1998. p.1-22.

43. **Olson SH, Gangnon R, Eiguero E, Durieux L, Guegan JF, Foley JA.** Links between climate and malaria in the Amazonas Basin. Emerg Infect Dis. 2009;15:659-62. https://doi.org/10.3201/eid1504.080822

44. **Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R.** El dengue en Colombia: de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá: Ed. Guías de Impresión Ltda.; 2012. p. 248.

45. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Estado del arte para la prevención y control del dengue en las Américas. Washington, D.C: OPS; 2014. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=25891&Itemid=270.

46. **San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, *et al*.** The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. Am J Trop Med Hyg. 2010;82:128-35. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0346

47. **Galea S, Vlahov D.** Urbanización. En: Frumkin H, editor. Salud ambiental: de lo global a lo local. México: McGraw-Hill; 2010. p. 422-50.

48. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, D.C.: OPS; 1995.

49. **Instituto Nacional de Salud.** Vigilancia del dengue por laboratorio: Colombia, 2006-2011. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2011.

50. **Patz JA, Martens WJ, Focks DA, Jetten TH.** Dengue fever epidemic potential as projected by general circulation models of global climate change. Environ Health Perspect. 1998;106:147-53.

51. **Peterson AE, Vegosen L, Leibler J, Davis MF, Feingold B, Silbergeld E.** Las enfermedades infecciosas emergentes y el medio ambiente. En: Galvao LA, Finkelman J, Henao S, editores. Determinantes ambientales y sociales de la salud. México: McGraw-Hill; 2010. p. 259-78.

52. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Diez enfermedades transmitidas por vectores que ponen en riesgo a la población de las Américas. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9438%3A2014-10-vector-borne-diseases-that-put-population-americas-at-risk&catid=1443%3Aweb-bulletins&Itemid=135&lang=es.

53. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Plan Nacional de Respuesta a la Introducción del Virus Chikungunya en Colombia, 2014. Subdirección de enfermedades transmisibles. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2014. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/PLAN%20NACIONAL%20DE%20RESPUESTA%20CHIKUNGUNYA%20COLOMBIA%202014.pdf.

54. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Plan de contención de la introducción del virus Zika. Subdirección de enfermedades transmisibles. Bogotá, D.C, 2014. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/virus-zika.aspx.

55. **Patz JA, Christenson M.** El cambio climático y la salud. En: Galvao LA, Finkelman J, Henao S, editores. Determinantes ambientales y sociales de la salud. México: McGraw-Hill; 2010. p. 215-32.

56. **Rosenlof KH, Terray L, Deser C, Clement A, Goosse H, Davis S.** Los cambios en la variabilidad asociada con el cambio climático. En: Asrar GR, Hurrell JW, editores. La ciencia del clima para servir a la sociedad. Washington, D.C: Springer; 2013. p. 249-71.

57. **Gubler DJ.** Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st century. Trop Med Health. 2011;39 (Supl.4):3-11. https://doi.org/10.2149/tmh.2011-SO5

58. **Instituto Nacional de Salud.** Informe de leishmaniasis 2005. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2005. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/Leishmaniasis%202006.pdf.

59. **Instituto Nacional de Salud.** Informe de leishmaniasis, 2015. Bogotá, 2005. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/Leishmaniasis%202005.pdf.

60. **Ministerio de Salud y Protección Social**. Plan para atención de desmovilizados en campamentos de zonas de concentración en el postconflicto. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2016.

61. **Bradt DA, Drummond CM.** Rapid epidemiological assessment of health status in displaced populations--an evolution toward standardized minimum, essential data sets. Prehosp Disaster Med. 2003;18:178-85.

62. **Cruz-Chan JV, Valenzuela J, Dumonteil E.** Leishmaniasis in the Americas. En: Franco-Paredes C, Santo-Preciado JI, editores. Enfermedades Tropicales Desatendidas – América Latina y el Caribe. Boston: Springer; 2016. p.113-28.

63. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Plan de certificación de la interrupción de la transmisión vectorial intradomiciliaria de *T. cruzi* por *Rhodnius prolixus* en áreas prioritarias en Colombia: Informe a comisión de verificación de la interrupción en municipios prioritarios. Subdirección de Enfermedades Transmisibles. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013.

64. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Leishmaniasis: datos, mapas y estadísticas, 2016. Fecha de consulta: 12 de enero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754.

65. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Guía de evaluación de los procesos de control de triatomineos y del control de la transmisión de *T. cruzi*. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2017. Disponible en: http://amro.who.int/Spanish/ad/dpc/cd/guia-anexo3-xi-incosur.pdf.

66. **Parra G, Restrepo-Isaza M, Restrepo B, Domínguez J.** Estudio de tripanosomiasis americana en dos poblados indígenas de la Sierra Nevada de Santa Marta. Colombia. Revista CES Medicina. 2004;18:43-50.

67. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Enfermedad de Chagas en las comunidades indígenas de la Sierra Nevada de Santa Marta. Bogotá, D.C: OPS; 2011. p. 66.

68. **Guhl F, Restrepo M, Angulo VM, Antunes CM, Campbell-Lendrum D, Davies CR.** Lessons from a national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. Trends Parasitol. 2005;21:259-62. https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.04.011

69. **United Nations High Commissioner for Refugees.** Situación de derechos individuales y colectivos del pueblo Hitnü – 2012, Resguardos La Vorágine y San José del Lipa. Arauca: ACNUR; 2013. p. 20.

70. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Actualización del plan de certificación de la interrupción de la transmisión vectorial intradomiciliaria de *T. cruzi* por *Rhodnius prolixus* en áreas prioritarias en Colombia, 2014-2021. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2016.

71. **Piñeros JG.** Malaria y determinantes sociales de la salud: un nuevo marco heurístico desde la medicina social latinoamericana. Biomédica. 2010;30:178-87. https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i2.181

72. **Breilh J.** La determinación social de la salud como herramienta de transformación hacia una nueva salud pública (salud colectiva). Rev Fac Nac Salud Pública. 2013;31(Supl.1):S13-27.

73. **Mesa-Ridel G, Rodríguez I, Teja J.** Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas. Rev Panam Salud Pública. 2004;15:285-87. https://doi.org/10.1590/S1020-49892004000400014

74. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Estrategia de Gestión Integrada para la Promoción, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores-ETV, 2012-2021. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013. p. 169.

75. **World Health Organization.** Handbook for Integrated Vector Management. Geneva: WHO; 2012. Fecha de consulta: 10 de enero de 2017. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44768/1/9789241502801_eng.pdf.

76. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Plan Decenal de Salud Pública, 2012-2021. Fecha de consulta: 10 de enero de 2017. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20%20Documento%20en%20consulta%20para%20aprobaci%C3%B3n.pdf.

Biomédica 2017;37(Supl.2):41-9
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3469

ARTÍCULO ORIGINAL

Distribución espacial de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en el área rural de dos municipios de Cundinamarca, Colombia

Laura Cabezas[1,2], Wilson Cabanzo[2], Fernando Santa[2], Víctor Alberto Olano[1], Diana Sarmiento[1], Sandra Vargas[1], Juan Felipe Jaramillo[1], Thor-Axel Stenstrom[3], Hans J. Overgaard[4], María Inés Matiz[1]

[1] Instituto de Salud y Ambiente, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Facultad de Ingeniería, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, D.C., Colombia
[3] SARChI Chair, Institute for Water and Wastewater Technology, Durban University of Technology, Durban, South Africa
[4] Faculty of Science and Technology, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway

Introducción. Es difícil adaptar o formular nuevas estrategias para el control del dengue en las áreas rurales debido a la dispersión de los hogares y a la falta de conocimiento sobre la presencia y el comportamiento del vector en estas áreas. El análisis de los datos espaciales podría ayudar a comprender las dinámicas temporales y espaciales relacionadas con la transmisión de enfermedades transmitidas por vectores en las zonas rurales y, por lo tanto, contribuir a la prevención y el control del dengue.
Objetivo. Determinar la probabilidad de la presencia del vector del dengue, *Aedes aegypti*, en el área rural de los municipios de Anapoima y La Mesa, Cundinamarca, Colombia.
Materiales y métodos. Se visitaron 102 viviendas del área rural, se inspeccionaron los criaderos potenciales del mosquito *A. aegypti* y se capturaron las formas adultas encontradas en su interior. La probabilidad de la presencia o la ausencia del vector en el área de estudio, se estableció mediante el método de interpolación espacial kriging.
Resultados. La región con mayor probabilidad para la presencia del vector se encontró en la parte central, cerca de los centros urbanos de los dos municipios.
Conclusión. Los análisis de las dinámicas espacio-temporales de los vectores de enfermedades pueden utilizarse en los sistemas para su vigilancia, con el fin de complementar los métodos usados actualmente, optimizar la determinación de las áreas de intervención de control vectorial y ahorrar recursos.

Palabras clave: *Aedes aegypti*; dengue; análisis espacial; salud pública; vectores de enfermedades; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3469

Spatial distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the rural area of two municipalities of Cundinamarca, Colombia

Introduction: It is difficult to adapt or create new strategies for dengue control in rural areas due to the dispersion of homes and the lack of knowledge about the presence and behavior of the vector in these areas. Spatial data analysis could help understand time and space dynamics related to the transmission of vector-borne diseases in rural areas and, thus, contribute to the prevention and control of dengue.
Objective: To determine the probability of the presence of the dengue vector *Aedes aegypti* in the rural area of the municipalities of Anapoima and La Mesa, in the central area of Colombia.
Materials and methods: The probability of the presence or absence of the vector in the study area was determined by means of the kriging spatial interpolation method.
Results: The region with the highest probability of the presence of the vector was located in the central part, close to the urban centers of both municipalities.
Conclusion: This study shows the importance of geostatistics for the surveillance of vector-borne diseases and the analysis of time and space dynamics of vector insects and of diseases transmitted by them.

Key words: *Aedes aegypti*; dengue; spatial analysis; public health; disease vectors; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3469

Contribución de los autores:
Laura Cabezas participó en todas las etapas del estudio.
Wilson Cabanzo y Fernando Santa: formulación, diseño, análisis e interpretación de los datos
Víctor Alberto Olano: datos entomológicos y análisis e interpretación de los datos
María Inés Matiz: datos entomológicos
Todos los autores participaron en la redacción y la revisión crítica del manuscrito.

El dengue es actualmente la enfermedad arboviral más común en seres humanos, con 390 millones de casos anuales en el mundo (1). En Colombia, es un problema de salud pública de carácter prioritario en el contexto regional y nacional (2). Hasta la semana epidemiológica 52 de 2015 se notificaron 94.916 casos, 98,6 % de los cuales correspondieron a dengue y, 1,4 %, a dengue grave (3). En el aumento de la incidencia de esta enfermedad influyen, además de los factores climáticos, los procesos de empobrecimiento y de urbanización no planificada (4,5).

El principal vector del dengue en el país, *Aedes aegypti* (L), se caracteriza por ser una especie muy antropofílica que se desarrolla principalmente en recipientes con agua limpia (6) y, según los reportes más recientes, se encuentra en todos los departamentos hasta los 2.302 msnm (7). El aumento del número de potenciales criaderos del mosquito se ve directamente influenciado por la falta de un servicio continuo de abastecimiento de agua, lo que lleva a su almacenamiento, muchas veces inadecuado (tanques bajos y albercas), dentro de los domicilios, así como por la falta de saneamiento básico que resulta en la disposición de residuos sólidos a campo abierto, especialmente de residuos que pueden contener agua lluvia, problemas que se presentan con mayor frecuencia en las áreas rurales (2).

Debido a las múltiples causas que condicionan la transmisión del dengue tanto en áreas urbanas como rurales, resulta difícil idear estrategias orientadas al control exitoso de esta enfermedad (6). Por tal razón, es necesario elaborar estrategias integrales e intersectoriales de control del vector y prevención de la enfermedad que respondan a las características de los lugares y a los patrones en que estas se presentan (8). En este contexto, la estadística espacial permite analizar patrones espaciales de las enfermedades, y determinar la aparición de los vectores y la ubicación de las áreas de riesgo donde deben focalizarse las acciones de manera más eficiente (9,10).

El análisis geoestadístico permite examinar el comportamiento de una variable en el espacio. La herramienta básica de dicho análisis es el variograma, el cual se usa para cuantificar la dependencia secuencial entre las observaciones, estimar los valores en lugares no muestreados y, a partir de un modelo, generar una superficie de interpolación (11).

El objetivo de este estudio fue establecer las áreas geográficas con mayor probabilidad para la presencia del mosquito *A. aegypti* mediante el método ordinario de interpolación kriging. Este trabajo hace parte de los resultados de un proyecto de intervenciones integrales para la prevención del dengue y de la diarrea en escuelas rurales en Colombia (12).

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en 34 veredas, 17 en el municipio de Anapoima y 17 en el municipio de La Mesa de la Provincia del Tequendama, departamento de Cundinamarca, Colombia (figura 1). En Colombia, las veredas son áreas rurales en donde las viviendas están dispersas (13).

El municipio de Anapoima está ubicado entre los 500 y los 1.000 msnm; sus coordenadas geográficas son 4° 33' 01'' N de latitud y 74° 32' 10'' O de longitud, y tiene una superficie de 124,2 km^2. El promedio de la precipitación total anual es de 1.300 mm y la temperatura promedio varía entre 22 °C y 28 °C (14). En el 2012, Anapoima contaba con 12.731 habitantes, de los cuales 57 % vivía en zonas rurales (15). Las formaciones vegetales del municipio corresponden a bosque seco tropical y a bosque húmedo premontano, según el sistema de zonas de vida de Holdridge (16).

El municipio de La Mesa está entre los 1.000 y 2.100 msnm; sus coordenadas geográficas son 4° 37' 49'' N de latitud y 74° 27' 45'' O de longitud, y tiene una superficie de 148 km^2. La precipitación anual es de 1.300 mm y la temperatura media anual es de 22 °C (17). Las formaciones vegetales de La Mesa corresponden a bosque húmedo premontano y a bosque húmedo montano bajo (16). En el 2012, tenía 29.997 habitantes, de los cuales 45 % vivía en zonas rurales (15).

La actividad económica de los dos municipios se basa principalmente en la agricultura, con cultivos de caña de azúcar, café y árboles frutales; también, desarrollan otras actividades como la ganadería y el turismo (14,17).

Recolección de la información

La información se recolectó durante el mes de octubre de 2012 en las veredas de los municipios que tenían escuela (figura 1).

Correspondencia:
Laura Viviana Cabezas, Instituto de Salud y Ambiente, Universidad El Bosque, Calle 131 N° 7A-68, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 648 9000, extensiones 1417 y 1181
lcabezasp@unbosque.edu.co

Recibido: 16/08/16; aceptado: 29/03/17

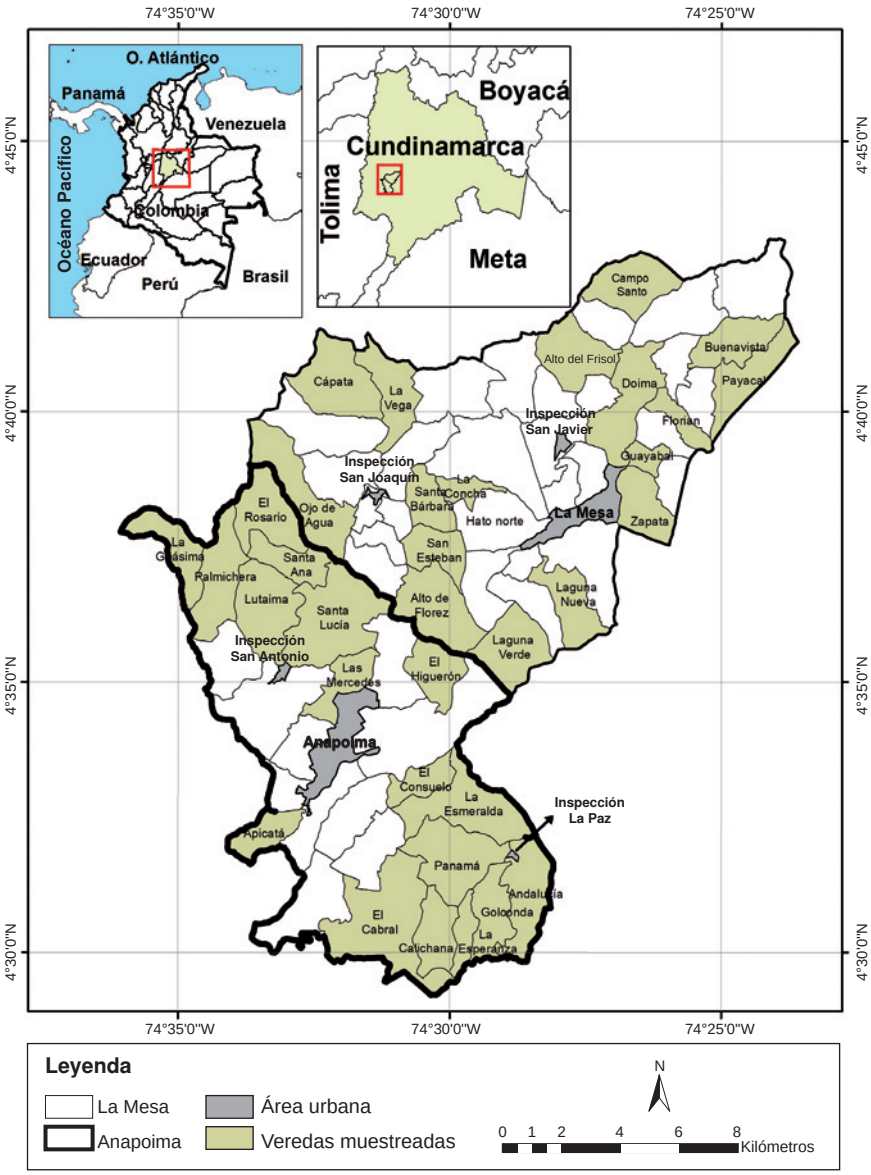


Figura 1. Mapa del área de estudio en el cual se ven las veredas analizadas en los municipios de Anapoima y La Mesa, Cundinamarca, Colombia

En cada vereda se seleccionaron tres viviendas aleatoriamente. Se inspeccionaron 102 viviendas en el área rural de los dos municipios. En cada hogar se registró la ubicación geográfica y la altitud, y se buscaron los criaderos potenciales del mosquito en depósitos naturales y artificiales, dentro de ellos y en su cercanía, entre las 08:00 y las 12:00 horas y entre las 14:00 y las 17:00, con el fin de recolectar las formas inmaduras de los mosquitos según la metodología descrita en Olano, *et al.* (18).

Se inspeccionaron albercas, baldes, bebederos de animales, tanques bajos, elevados y subterráneos, y residuos como botellas, llantas y otros.

Se capturaron los mosquitos adultos en cada vivienda usando aspiradores eléctricos durante 30 minutos (19). Posteriormente, se hizo la determinación taxonómica de las especies de los mosquitos (formas inmaduras y adultas) mediante claves taxonómicas (20,21).

Análisis de los datos

Se analizó la información de 101 viviendas, ya que los datos de una vivienda del municipio de Anapoima se perdieron. La información recolectada en la encuesta se digitó y depuró en Microsoft Excel, versión 2013.

La infestación de las formas inmaduras y de las adultas se calculó mediante el índice de Breteau, es decir, la relación de los recipientes positivos por cada 100 viviendas inspeccionadas, y los índices de vivienda y de depósitos, los cuales relacionan el porcentaje de viviendas y de depósitos con la presencia de formas inmaduras de *A. aegypti,* así como el porcentaje de formas adultas en las viviendas (22).

La variable de estudio se estableció como binaria (1 o 0): presencia (1) o ausencia (0) de formas inmaduras y adultas de *A. aegypi*. El análisis de la distribución espacial del vector se hizo mediante el programa estadístico *R Project for Statistical Computing* (23). Con el paquete GeoR (24) se hizo el análisis geoestadístico con el método de interpolación *kriging* indicador, conocido como una forma no lineal del *kriging* ordinario, en el cual el valor de los datos originales es transformado de una escala continua a una escala binaria (25).

Una vez se visualizaron y exploraron los datos (figura 2), se hizo el análisis estructural que consistió en la estimación del semivariograma experimental y el ajuste a un modelo teórico (el esférico, el exponencial o el de Matérn), que describiera la estructura de correlación espacial que puede representar la distribución del mosquito *A. aegypti* en área rural. La estimación puntual de los parámetros (pepita, meseta y rango) de estos modelos se hizo a partir de los métodos de mínimos cuadrados (ordinarios y ponderados) y de máxima verosimilitud (26).

Se evaluó la calidad de las predicciones de los modelos estimados a partir del error que se produce en cada uno de ellos; con el modelo que presentó el error medio cuadrático más pequeño, se generó el modelo de predicción para la presencia de *A. aegypti* en área rural. Por último, los mapas resultantes se editaron con el programa ArcGIS Desktop 10.1 (27).

Resultados

Resultados entomológicos

El número de veredas y de viviendas con presencia de formas adultas de *A. aegypti* fue mayor que el de aquellas con formas inmaduras en los dos municipios (cuadro 1).

El índice de Breteau fue mayor en el municipio de La Mesa, con 51 depósitos positivos por 100 viviendas, y en Anapoima se encontraron adultos en 34 de cada 100 viviendas.

En cuanto a los depósitos inspeccionados (339), se encontraron 43 (12,7 %) depósitos positivos para formas inmaduras de *A. aegypti* en los dos municipios: 26 (15,1 %) en La Mesa y 17 (10,2 %) en Anapoima. La mayoría de depósitos inspeccionados eran tanques bajos (182, 54,2 %) y en 73,8 % de ellos se encontró el vector (31); en tanto que 17,3 % (58) de los depósitos inspeccionados eran albercas, y en 21,4 % (9) se encontraron formas inmaduras.

Superficie resultante de interpolación

De las 101 viviendas inspeccionadas, en 65 se registró la presencia del mosquito *A. aegypti* (formas inmaduras y adultas) y 36 fueron negativas para la presencia del vector, de las cuales 14 se ubicaron en el municipio de Anapoima y 22 en La Mesa. La distribución de las viviendas inspeccionadas en el área de estudio se puede apreciar en la figura 2.

Al estimar y analizar el semivariograma experimental omnidireccional y direccional, se encontró que el mejor comportamiento estructural de la

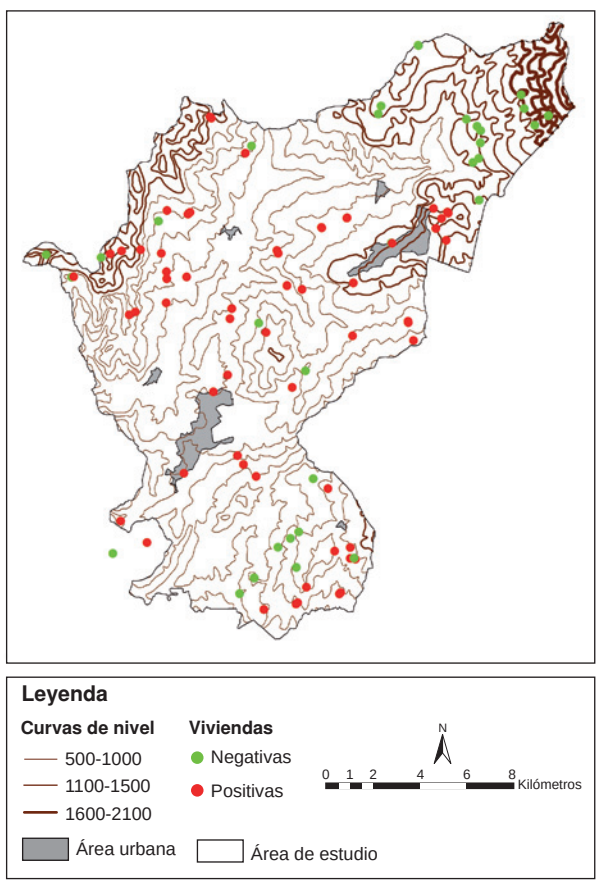


Figura 2. Distribución de las viviendas con presencia o ausencia de *Aedes aegypti* en el área de estudio

correlación espacial de los datos se produjo en una distancia máxima de 12.500 m (cuadro 2). Se estableció que el modelo teórico de semivarianza que mejor se ajustaba al comportamiento del fenómeno estudiado era el modelo de Matérn, cuyo semivariograma permite controlar la suavidad del campo aleatorio mediante el parámetro de forma kappa (25) (cuadro 2).

Según los nuevos parámetros estimados para los modelos de semivarianza y los resultados del modelo de Matérn, el rango o la distancia establecida antes de alcanzar la meseta fue de 3.069 m, definida esta como el límite de la dependencia espacial (26). El valor kappa inferior a 0,5 (0,175) indicó que se había alcanzado rápidamente el valor de la meseta del semivariograma, es decir que la dependencia espacial se presentó en rangos menores (27) (cuadro 2).

Los resultados de la validación cruzada mostraron que el menor error de predicción (0,006), estimado por mínimos cuadrados ordinarios, se produjo en el modelo de Matérn. El mapa de predicción de la presencia o ausencia del vector en el área rural de los dos municipios se generó a partir de este modelo (figura 3).

En dicho mapa aparecen en color rojo las zonas con mayor probabilidad de presencia del mosquito en el área de estudio, zonas que corresponden espacialmente a las veredas de Santa Lucía, Las Mercedes, Lutaima, Santa Ana, San Antonio y San José, en el municipio de Anapoima, y a las veredas de San Esteban, El Tigre, San Martín y Santa Bárbara, en el municipio de La Mesa (figura 3). Las veredas en donde se encontró menor probabilidad fueron Anatolí, La Esperanza y Campo Santo del municipio de La Mesa.

Discusión

La región con mayor probabilidad de presencia del vector se situó en la parte central, en cercanía de los centros urbanos de los dos municipios (figura 3). Entre las posibles explicaciones pueden mencionarse los límites del registro altitudinal del área de estudio (figura 2), donde el vector está presente entre los 500 y los 1.500 msnm. En otros estudios se ha señalado la movilidad poblacional como un factor de riesgo para la presencia del vector en aquellos lugares más próximos a los centros urbanos (1,28).

Recientemente se ha registrado la transmisión del dengue en áreas rurales. Según el registro nacional, en el 2012, 19,4 % de los casos se presentó en centros poblados y en el área rural dispersa, y 80,6 %, en cabeceras municipales (29). Hasta la semana epidemiológica 51, se habían notificado 50 casos de dengue grave y 1.803 casos de dengue en el departamento de Cundinamarca (30). En el área de estudio se registraron, en ese mismo año, 77 casos de dengue en el municipio de Anapoima

Cuadro 1. Infestación de formas inmaduras y adultas de *Aedes aegypti* por municipio

Municipio	Índice de formas inmaduras				Índice de adultos		
	Veredas (%)	Viviendas (%)	Depósitos (%)	Índice de Breteau	Veredas (%)	Adultos (%)	Total de adultos
Anapoima	10/17 (58,8)	14/50 (28)	17/167 (10,2)	34	14/17 (82,4)	34/50 (68)	211
La Mesa	8/17 (47,1)	13/51 (25,5)	26/172 (15,1)	51	11/17 (64,7)	26/51 (51)	411
Total	18/34	29/101	43/339	42	25/34	60/101	622

Cuadro 2. Ajuste de los modelos teóricos de semivarianza (esférico, exponencial y de Matérn) a la estructura de correlación espacial para la distribución del mosquito

Modelo	Meseta		Rango		Pepita		K	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Esférico	0,14	0,1953	2598,63	6139	0,05	NA	NA	NA
Exponencial	0,19	0,1953	3573,12	6139	0,07	NA	NA	NA
de Matérn	0,15	0,1603	1624,15	3069	0,05	NA	0,7	0,175

a: Parámetros (meseta, rango, pepita y kappa) escogidos por ajuste visual del semivariograma para los modelos esférico, exponencial y de Matérn. b: Parámetros (meseta, rango, pepita y kappa) de las nuevas estimaciones para los modelos de semivarianza (esférico, exponencial y de Matérn); parámetro de forma kappa para el modelo de Matérn; NA: no aplica

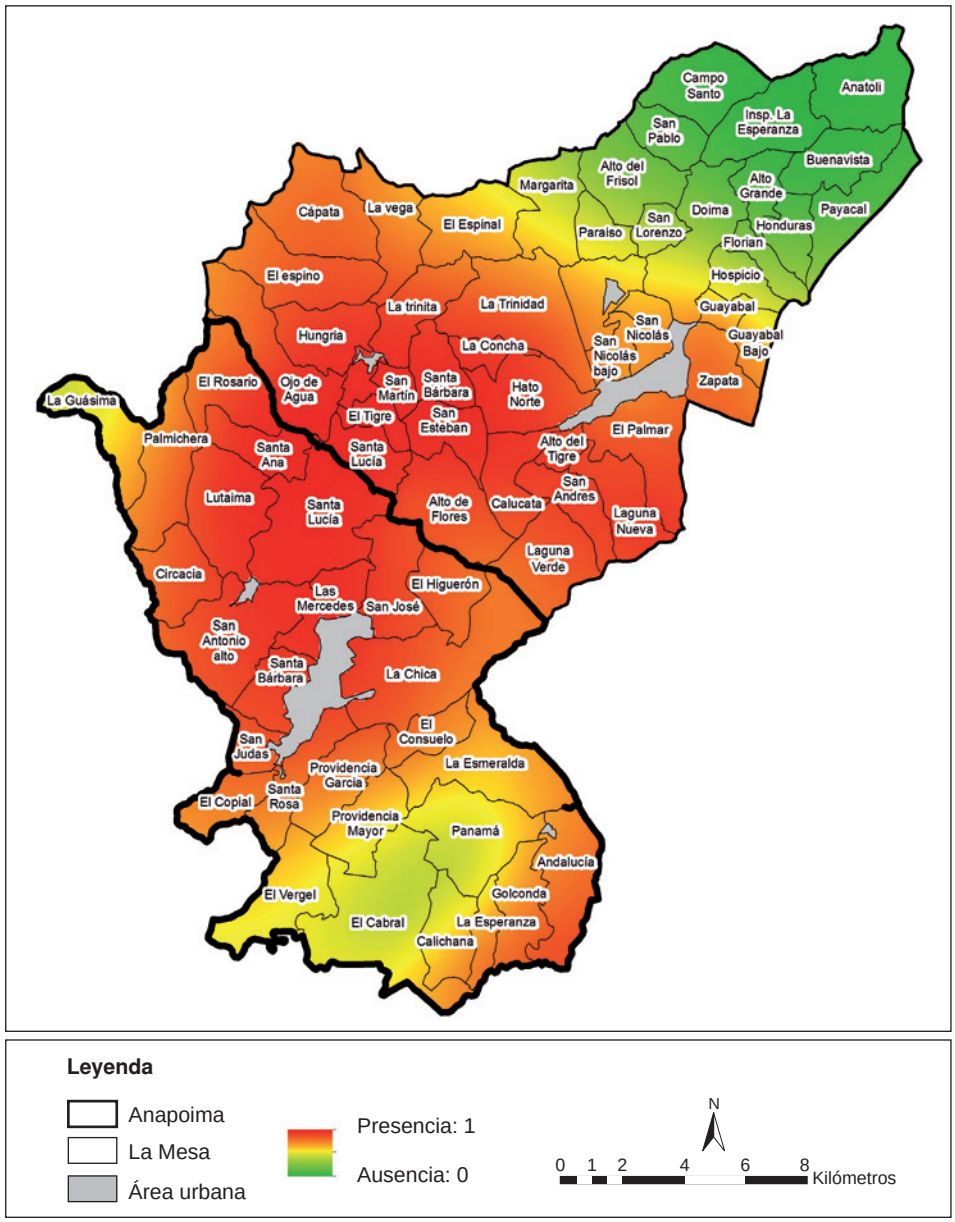


Figura 3. Mapa con la predicción de la presencia de *Aedes aegypti* en el área rural de los municipios de Anapoima y La Mesa, Cundinamarca

y 163 en La Mesa (31). Además, se encontró que los cuatro serotipos del virus del dengue circulaban en el área rural, después de detectar el virus en hembras de *A. aegypti* (32).

En este estudio, el índice de Breteau fue de 34 en Anapoima y de 51 en La Mesa, lo cual indica que existe riesgo de transmisión del dengue en el área rural de los dos municipios. Es importante resaltar que, aunque estos indicadores evidencian la infestación con el vector, no reflejan suficientemente el riesgo de transmisión de la enfermedad (33,34). Por ello, el uso de metodologías de estadística espacial como apoyo en la vigilancia del *A. aegypti* mediante los índices de infestación es de gran utilidad (35,36).

Este estudio se llevó a cabo durante época lluviosa, en la cual aparecen nuevos sitios de cría de *A. aegypti*, tal como se ha confirmado en otros estudios (37,38). Entre los criaderos positivos para *A. aegypti* en este estudio, se encontró que las albercas y los tanques bajos de almacenamiento de agua para consumo presentaron el mayor

porcentaje de infestación, similar a lo hallado en estudios realizados en los departamentos de Atlántico, Antioquia y Cundinamarca (39-41).

Específicamente, en el municipio de Girardot en Cundinamarca, una investigación en viviendas reveló que, aunque no son los que más contienen este vector, algunos recipientes como tarros, latas, vasijas y botellas pueden convertirse en criaderos del mosquito cuando aumentan las precipitaciones (42). El hecho de que este estudio se realizara en época lluviosa posiblemente contribuyó a optimizar el modelo de predicción de la distribución del vector. Con la reducción de la cantidad de sitios de cría en época seca, es posible que el área de distribución del mosquito disminuya.

Es importante tener en cuenta que el presente estudio se llevó a cabo en el área rural y que, según las estadísticas, 41,3 % de la población del área rural a nivel nacional no cuenta con abastecimiento de agua mediante sistemas de acueducto y 76 % no tiene servicio de recolección de residuos sólidos (43).

En el 2007, en el municipio de Anapoima, el suministro de agua por acueducto en las viviendas del área urbana (cabecera municipal) era de 100 % y en el área rural era de 40 %, en tanto que la cobertura del servicio de aseo en el área urbana (cabecera municipal y centro poblado de las dos inspecciones) era de 100 %, pero el área rural no tenía cobertura (44).

En el 2000, en el municipio de La Mesa, el abastecimiento de agua por acueducto en las viviendas del área urbana (cabecera municipal) era de 97 % y en el área rural era de 42 %, y la cobertura del servicio de aseo era de 90 % en la cabecera municipal, de 45 % en el centro poblado de las dos inspecciones y de 3 % en el área rural dispersa (45).

Estas condiciones inciden directamente en el aumento del número de criaderos potenciales del mosquito vector. En estudios previos en esta área, se encontró que los residuos sólidos y los depósitos de agua para consumo humano eran los principales sitios de cría en área rural (18) (Cabezas L, Salas S, Matiz ME, Jaramillo JF, Olano VA, Sarmiento D. Residuos sólidos como criaderos potenciales de *Aedes aegypti* en escuelas y viviendas aledañas en el área rural del municipio de Apulo, Cundinamarca. Biomédica 2011;31(Suppl.3):25. Memorias, XX Congreso Federación Latinoamericana de Parasitología y XV Congreso Asociación Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical).

Además de la influencia de factores locales en la presencia de *A. aegypti*, también es importante resaltar la influencia de factores ambientales tales como la precipitación, la temperatura y la humedad relativa (46).

El análisis mediante el método de interpolación *kriging* demostró que el modelo de Matérn era el más conveniente para generar la superficie de interpolación de la presencia del mosquito, pues arrojó el menor valor en el error de predicción. Cabe resaltar que con este modelo se caracteriza mejor la variabilidad espacial a distancias cortas, como lo demuestran otros estudios (47,48).

Las tecnologías geoespaciales, específicamente el método de interpolación *kriging,* se aplican en diferentes campos, como el estudio de las enfermedades transmitidas por vectores y la planificación municipal, entre otros (49,50). La generación de superficies de interpolación con el *kriging* indicador para la presencia del vector del dengue permite visualizar y determinar las áreas con mayor probabilidad de infestación y, por ende, con mayor exposición a factores de riesgo como la picadura del mosquito *A. aegypti*, en este caso, en el área rural de dos municipios de Colombia en 2012.

La incorporación de los sistemas de información geográfica a los sistemas de vigilancia en salud pública refleja la importancia del componente geográfico en la prevención y el control de enfermedades, pues complementa el análisis de su dinámica en tiempo y espacio. En los últimos años se ha evidenciado el aumento del uso de esta herramienta en diferentes campos de aplicación, pero existe poca información sobre su uso por parte de las autoridades nacionales y regionales en temas de vigilancia en salud pública.

En este estudio se demostró que los análisis de las dinámicas espacio-temporales de los vectores de enfermedades pueden utilizarse en sistemas de vigilancia de las enfermedades transmitidas por vectores como complemento de los métodos actuales para optimizar la determinación de las áreas de intervención de control vectorial y, de esta manera, reducir costos. Cabe resaltar que dicha predicción será más precisa en la medida en que se involucren otras variables climáticas, geográficas, sociales y epidemiológicas.

Agradecimientos

A las alcaldías y secretarías de salud y educación de los municipios de Anapoima y La Mesa, a la comunidad educativa de las escuelas rurales de

estos municipios y al personal de campo: Humberto Mosquera, Nancy Herrera y Rosa Silva, por su colaboración durante el desarrollo de este trabajo. Especial agradecimiento al doctor Miguel Otero Cadena, Vicerrector de Investigaciones de la Universidad El Bosque, por su apoyo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Financiación

El proyecto contó con la financiación del Consejo de Investigaciones de Noruega (Ref. 201349), la Fundación Lazos de Calandaima y la Universidad El Bosque.

Referencias

1. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*.** The global distribution and burden of dengue. Nature 2013;496:504-7. https://doi.org/10.1038/nature12060
2. **Padilla JC, Rojas DP, Gómez RS.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá, D.C.: Guías de Impresión Ltda.; 2012.
3. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico Semanal número 52. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2015.
4. **Franco Á.** La globalización de la salud: entre el reduccionismo económico y la solidaridad ciudadana. Rev Fac Nac Salud Pública. 2001;19:43-55.
5. **Gubler D.** Dengue, urbanization and globalization: The Unholy Trinity of the 21st century. Trop Med Health 2011;39: 3-11. https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05
6. **McCall PJ, Kittayapong P.** Working paper 6.2. Control of dengue vectors: Tools and strategies. En: Scientific Working Group. Report on Dengue. Geneva: WHO; 2006. p. 110-9.
7. **Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, *et al*.** Presencia de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. Biomédica. 2016;36:303-8. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301
8. **De-Carvalho-Alves M, Ampélio-Pozza E.** Indicator kriging modeling epidemiology of common bean anthracnose. Applied Geomatics. 2010;2:65-72. https://doi.org/10.1007/s12518-010-0021-1
9. **Graham AJ, Atkinson PM, Danson FM.** A spatial analysis in epidemiology. Acta Trop. 2004;91:219-25. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.05.001
10. **Pfeiffer D, Robinson T, Stevenson M, Stevens K, Rogers D, Clements A.** Spatial analysis in epidemiology. New York: Oxford University Press; 2008.
11. **Armstrong M.** Basic linear geostatistics. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1998.
12. **Overgaard HJ, Alexander N, Matiz MI, Jaramillo JF, Olano VA, Vargas S, *et al*.** A cluster-randomized controlled trial to reduce diarrheal disease and dengue entomological risk factors in rural primary schools in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0005106. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005106
13. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE.** Conceptos básicos. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/inf_geo/4Ge_ConceptosBasicos.pdf.
14. **Alcaldía de Anapoima.** Sitio web del municipio de Anapoima en Cundinamarca. Fecha de consulta: 10 de julio de 2015. Disponible en: http://www.anapoima-cundinamarca.gov.co/index.shtml#6.
15. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE.** Estimaciones de población 1985 - 2005 y proyecciones de población 2005 – 2020. Total municipal por área. Bogotá: DANE; 2005.
16. **Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** Formaciones vegetales de Colombia: memoria explicativa sobre el mapa ecológico. Plancha N° 9. Bogotá: Instituto Geográfico Agustín Codazzi; 1963.
17. **Alcaldía de La Mesa.** Sitio web del municipio de La Mesa en Cundinamarca. Fecha de consulta: 10 de julio de 2015. Disponible en: http://www.lamesa-cundinamarca.gov.co/index.shtml#3.
18. **Olano VA, Matiz MI, Lenhart A, Cabezas L, Vargas SD, Jaramillo JF, *et al*.** Schools as potential risk sites for vector-borne disease transmission: Mosquito vectors in rural schools in two municipalities in Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 2015;31:212-22. https://doi.org/10.2987/moco-31-03-212-222.1
19. **Vázquez-Prokopec G, Galvin W, Kelly R, Kitron U.** A new, cost-effective, battery-powered aspirator for adult mosquito collections. J Med Entomol. 2009;46:1256-9. https://doi.org/10.1603/033.046.0602
20. **González R, Darsie RF, Jr.** Clave ilustrada para la determinación genérica de larvas de Culicidae de Colombia y del Nuevo Mundo. Boletín del Museo de Entomología. 1996;4:21-37.
21. **Lane J.** Neotropical Culicidae. II ed. Sao Paulo: Editora da Universidade de Sao Paulo; 1953. p. 638, 640, 641.
22. **Ministerio de Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue. Bogotá: Ministerio de Protección Social; 2011. p. 37.
23. **Development Core Team.** R: The R Project for Statistical Computing. 3.0.2. Vienna: The R Foundation; 2015.
24. **Ribeiro P, Diggle P.** GeoR: A package for analysis of geoestatistical data. 5.1. Fecha de consulta: 10 de julio de 2015. Disponible en: http://www.leg.ufpr.br/geoR/.
25. **Burrough PA, MacDonnell RA, Lloyd CD.** Principles of geographical information systems. 3rd. edition. Oxford: Oxford University Press; 2015. p. 189.
26. **Cressie N.** Statistics for spatial data. New York: John Wiley & Sons, INC; 1993. p. 91.
27. **Environmental Systems Research Institute.** ArcGIS Desktop. 10.1. New York: ESRI; 2015.

28. **Vázquez-Prokopec GM, Bisanzio D, Stoddard ST, Paz-Soldan V, Morrison AC, Elder JP, *et al*.** Using GPS technology to quantify human mobility, dynamic contacts and infectious disease dynamics in a resource-poor urban environment. PLoS One 2013;8:e58802. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058802

29. **Romero L.** Informe final del evento dengue, año 2012. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2013. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/DENGUE%20%202012.pdf.

30. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico Semanal N° 51 de 2012. Bogotá, D.C.: INS; 2012. p. 1-12. Fecha de consulta: 10 de julio de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2012%20Boletin%20epidemiologico_Semana%2051.pdf.

31. **Instituto Nacional de Salud.** Vigilancia rutinaria por evento municipal 2012. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx.

32. **Pérez-Castro R, Castellanos J, Olano V, Matiz M, Jaramillo J, Vargas S, *et al*.** Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111:233-40. https://doi.org/10.1590/0074-02760150363

33. **Bowman LR, Runge-Ranzinger S, McCall PJ.** Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: A systematic review of the evidence. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e2848. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002848

34. **Regis L, Souza WV, Furtado AF, Fonseca CD, Silveira JC, Ribeiro PJ, *et al*.** An entomological surveillance system based on open spatial information for participative dengue control. An Acad Bras Ciênc. 2009;81:655-62. https://doi.org/10.1590/S0001-37652009000400004

35. **Niño L.** Uso de la función semivariograma y estimación kriging en el análisis espacial de un indicador entomológico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Biomédica. 2008;28:578-86. https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i4.64

36. **Niño L.** Interpolación espacial de la abundancia larval de *Aedes aegyti* para localizar focos de infestación. Rev Panam Salud Pública. 2011;29:416-22. https://doi.org/10.1590/S1020-49892011000600006

37. **Vezzani D, Velázquez SM, Schweigmann N.** Seasonal pattern of abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires city, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:351-6. https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000400002

38. **Wee LK, Weng SN, Raduan N, Wah SK, Ming WH, Shi CH, *et al*.** Relationship between rainfall and *Aedes* larval population at two insular sites in Pulau Ketam, Selangor, Malaysia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2013;44:157-66.

39. **Romero-Vivas CM, Arango-Padilla P, Falconar AK.** Pupal-productivity surveys to identify the key container habitats of *Aedes aegypti* (L.) in Barranquilla, the principal seaport of Colombia. Ann Trop Med Parasitol. 2006l;100 (Suppl.1):S87-95.

40. **Tinker M, Olano V.** Ecología del *Aedes aegypti* en un pueblo de Colombia, Suramérica. Biomédica. 1993;13:5-14. https://doi.org/10.7705/biomedica.v13i1.2041

41. **Romero-Vivas CM, Wheeler JG, Falconar AK.** An inexpensive intervention for the control of larval *Aedes aegypti* assessed by an improved method of surveillance and analysis. J Am Mosq Control Assoc. 2002;18:40-6.

42. **Alcalá L, Quintero J, González-Uribe C, Brochero H.** Productividad de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) en viviendas y espacios públicos en una ciudad endémica para dengue en Colombia. Biomédica. 2015;35:258-68. https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2567

43. **Departamento Nacional de Estadística - DANE.** Encuesta Nacional de Calidad de Vida. 2013. Fecha de consulta: 9 de junio de 2016. Disponible en: http://www.dane.gov.co/index.php/esp/estadisticas-sociales/calidad-de-vida-ecv/160-uncategorised/6014-encuesta-nacional-de-calidad-de-vida-2014, 2016

44. **Alcaldía de Anapoima**. Acuerdo N° 004 de 2008. "Por el cual se adopta el Plan de Desarrollo del municipio de Anapoima" 2008. Fecha de consulta: 17 de marzo de 2017. Disponible en: http://cdim.esap.edu.co/BancoMedios/Documentos%20PDF/plan%20de%20desarrollo%20anapoima%20-%20cundinamarca%202008%20-%202011.pdf.

45. **Alcaldía de La Mesa.** Acuerdo (sin número) de 2000. "Por el cual se adopta el Plan Básico de Ordenamiento Territorial Municipal, se clasifican y determinan usos del suelo y se establecen los sistemas estructurales. Municipio de La Mesa. 2000. Fecha de consulta: 17 de marzo de 2017. Disponible en: http://www.lamesa-cundinamarca.gov.co/apc-aa-files/32316232653861306334396338373037/PLAN_BASICO_ORDENAMIENTO_TERRITORIAL.pdf.

46. **Pham HV, Doan HT, Phan TT, Tran Minh NN.** Ecological factors associated with dengue fever in a central highlands Province, Vietnam. BMC Infect Dis. 2011;11:172. https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-172

47. **Marchant BP, Lark RM.** The Matérn variogram model: Implications for uncertainty propagation and sampling in geostatistical surveys. Geoderma 2007;140:337-45. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.04.016

48. **Minasny B, McBratney AB.** The Matérn function as a general model for soil variograms. Geoderma. 2005;128:192-207. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.04.003

49. **Molina AM, López LF, Villegas Gl.** Los sistemas de información geográfica (sig) en la planificación municipal. Rev EIA. 2005;4:21-31.

50. **Parra-Henao GJ.** Sistemas de información geográfica y sensores remotos. Aplicaciones en enfermedades transmitidas por vectores. CES Med. 2010;24:75-89.

Biomédica 2017;37(Supl.2):50-8
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3379

ORIGINAL ARTICLE

Insecticidal action of synthetic girgensohnine analogues and essential oils on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)

Juliana Cuadros[1], Aurora L. Carreño[1,2], Vladimir V. Kouznetsov[2], Jonny E. Duque[1]

[1] Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
[2] Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, LQOBio, Departamento de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introduction: The alkaloid girgensohnine has been used as a natural model in the synthesis of new alkaloid-like alpha-aminonitriles with insecticidal effect against disease vectors.
Objective: To evaluate the biocide activity of girgensohnine analogues and essential oils of *Cymbopogon flexuosus, Citrus sinensis* and *Eucalyptus citriodora* in stage I and stage V *Rhodnius prolixus* nymphs.
Materials and methods: We used a topical application model in tergites and sternites, as well as exposure to treated surfaces with different exploratory doses of each of the molecules and essential oils to determine the lethal doses (LD_{50} and LD_{95}).
Results: Analogue 3 showed the highest insecticidal activity with 83.3±16.7% of mortality when applied on tergites, 38.9±4.8% on sternites and 16.7±0% on treated surfaces in stage I nymphs at 72 hours (h) and 500 $mg.L^{-1}$. In stage V nymphs, the compounds induced mortality only in sternums (11.1±9.6% for analogue 6 and 5.5±4.7% for analogues 3 and 7 at 72 h and 1500 $mg.L^{-1}$). The lethal doses for molecule 3 on tergites in stage I nymphs were LD_{50} 225.60 $mg.L^{-1}$ and LD_{95} 955.90 $mg.L^{-1}$. The insecticidal effect of essential oils was observed only in stage I nymphs, with 11.1±4.8% for *C. flexuosus* when applied in sternites, while using exposure to surfaces treated it was 5.6±4.8% for *C. sinensis* applied on tergites and 8.3±0% on sternites at 72 h and 1000 $mg.L^{-1}$.
Conclusion: Synthetic girgensohnine analogues, and *C. flexuosus* and *C. sinensis* essential oils showed insecticidal activity in *R. prolixus.* Analogue 3 showed the greatest insecticidal activity among all molecules and oils evaluated under our laboratory conditions.

Key words: Triatominae; Chagas disease; insecticides; oils, volatile.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3379

Acción insecticida de análogos sintéticos de girgensohnina y de aceites esenciales sobre *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)

Introducción. El alcaloide natural girgensohnina se ha usado como modelo en la síntesis de nuevos análogos de alcaloidales alfa-aminonitrílicos con efecto insecticida en vectores de enfermedades.
Objetivo. Evaluar la actividad biocida de análogos de girgensohnina y de aceites esenciales de las plantas *Cymbopogon flexuosus, Citrus sinensis* y *Eucalyptus citriodora* en ninfas de estadios I y V de *Rhodnius prolixus.*
Materiales y métodos. Se empleó la aplicación tópica en terguitos, esternitos y superficies tratadas con diferentes dosis exploratorias de cada una de las moléculas y aceites esenciales para determinar las dosis letales (LD_{50} y LD_{95}).
Resultados. El análogo 3 tuvo la mayor actividad insecticida, con una mortalidad de 83,3±16,7% en los terguitos, de 38,9±4,8 % en los esternitos y de 16,7±0 % a las 72 horas en ninfas de estadio I expuestas a superficies tratadas y 500 $mg.L^{-1}$. En las ninfas de estadio V solo se presentó mortalidad en los esternitos (11,1±9,6 % con el análogo 6 y 5,5±4,7 % con los análogos 3 y 7 a las 72 h y 1.500 $mg.L^{-1}$). Las dosis letales para la molécula 3 en los terguitos de ninfas de estadio I fueron las siguientes: DL_{50}, 225,60 $mg.L^{-1}$y DL_{95}, 955,90 $mg.L^{-1}$. En cuanto a los aceites esenciales, el efecto insecticida solo se presentó con *C. flexuosus* (11,1±4,8%) en los esternitos de ninfas de estadio I expuestas a superficies tratadas; con *C. sinensis* (5,6±4,8%) en los terguitos y en los esternitos (8,3±0%) a las 72 horas y 1.000 $mg.L^{-1}$.

Author's contributions:
Vladimir V. Kouznetsov designed and synthesized the girgensohnine analogues.
Juliana Cuadros-Martínez carried out laboratory procedures, performed analyses and interpreted the data.
Jonny E. Duque performed analyses and interpreted the data.
Aurora L. Carreño participated in all stages of the research.
All authors participated in the writing of the paper.

Conclusión. Los análogos sintéticos del alcaloide girgensohnina y los aceites esenciales de *C. flexuosus* y *C. sinensis* exhibieron actividad insecticida en *R. prolixus*. El análogo 3 exhibió la mayor actividad insecticida de todas las moléculas evaluadas bajo las condiciones de laboratorio.

Palabras clave: Triatominae; enfermedad de Chagas; insecticidas; aceites volátiles.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3379

According to the World Health Organization (WHO), Chagas disease or American trypanosomiasis, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), affects the population in 21 Latin American countries. In places where this disease is endemic, the main mode of transmission is through contact with the feces of infected blood-sucking reduviid bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) (1-3) when the affected person rubs and spreads them to the eyes, the mouth or an open skin lesion (4). At present, there is no vaccine against the etiological agent of the disease and existing drugs are only partially effective with severe side effects (4,5).

There are approximately 151 described species of triatomines grouped into 15 genera and five tribes (6). The most important domiciled species involved in the transmission of *T. cruzi* are: *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (in the Southern Cone countries), *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (in Central America and northern South America), and *Triatoma dimidiate* Latreille, 1811, Phyllosoma complex, (7,8) (throughout the southern, central and eastern areas of the Gulf of México extending to Ecuador and northern Perú).

The estimated prevalence of trypanosomiasis in Colombia ranges from 700,000 to 1,200,000 inhabitants infected and 8 million at risk of acquiring the infection (9). The main vectors adapted to human habitations are, in order of importance, *R. prolixus* in the Andes, Caribbean, Orinoco and Amazon regions; *T. dimidiate* in the Andes, Caribbean and Orinoco regions; *T. venosa* (Stäl, 1872) in the Andes and Orinoco regions; *T. maculata* (Erichson,1878) in the Andes, Caribbean and Orinoco regions (10), and *Pastrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) in the Andes, Caribbean, Orinoco and Amazon regions (11-13). The department of Santander is one of the main endemic zones in Colombia.

Corresponding author:
Jonny E. Duque, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Parque Tecnológico y de Investigaciones Guatiguara, km 2 Vía El Refugio, Piedecuesta, Santander, Colombia
Telephone: (577) 634 4000, extension 3526
jonedulu@uis.edu.co

Received: 22/06/16; accepted: 02/05/17

The most effective method to prevent Chagas disease in Latin America is vector control (10) through conventional use of insecticides such as organochlorines, organophosphates, carbamates and pyrethroids (2). It is urgent to find natural active ingredients or new alkaloid-like molecules to replace these insecticides (14,15), as their constant use has generated resistance mechanisms in some Triatomine species of epidemiological importance (2). Among these new molecules, synthetic analogues of the girgensohnine alkaloid structure were designed and synthesized to inhibit the activity of acetylcholinesterase (AChE).

According to Carreño, *et al.* (16), these analogues, derivatives of alpha-aminonitriles, showed insecticidal activity on larvae of *Aedes aegypti*, the vector that transmits dengue disease, and the authors suggest this is a strong indication of its possible effect on other insects of medical interest, such as triatomines. Essential oils are another potential tool for insect control, due to their selectivity and minimal environmental effects and the fact that, in some cases, their action has been effective against insects that are resistant to commercial insecticides (14).

In this context, our objective was to evaluate the insecticidal activity of synthetic analogues of the girgensohnine alkaloid and of essential oils from *C. flexuosus, C. sinensis* and *E. citriodora* against stage I and V *R. prolixus* nymphs.

Materials and methods

Biological material

We used the reference strain of *R. prolixus* CINTROP -UIS. Adults were fed every eight days with blood of hens (*Gallus gallus*). For the bioassays we used stage I nymphs of 24 to 36 h of age and 0.2-0.3 mg of weight subjected to fasting since hatching, and stage V nymphs with 20-30 mg of weight and eight days of fasting.

Synthetic analogues and essential oils

We used the girgensohnine alkaloid as a natural model in the design and synthesis of 12 new synthetic analogues (figure 1). A Strecker reaction modified from commercial and inexpensive substitute benzaldehydes (3,4-dimethoxybenzaldehyde,

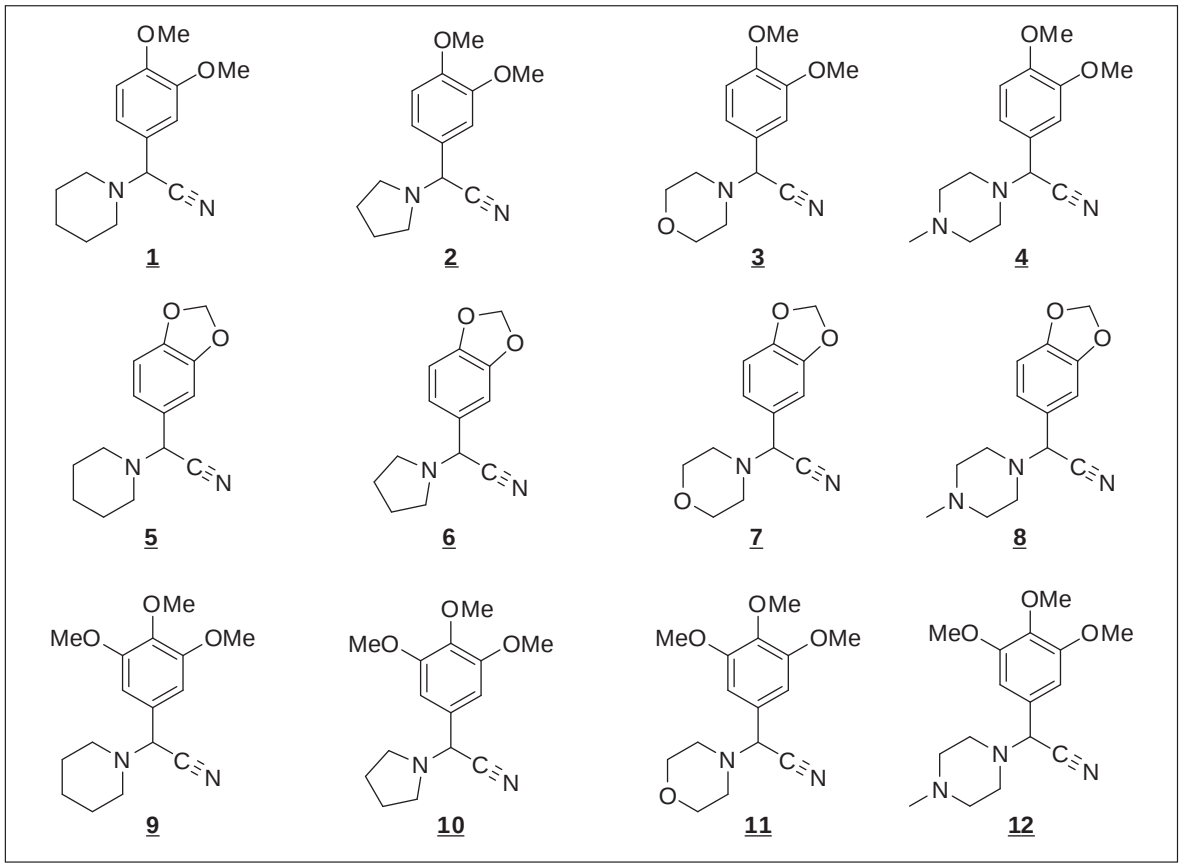


Figure 1. Synthetic alpha-aminonitriles evaluated

piperonal and 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde), four cyclic secondary amines (piperidine, pyrrolidine, morpholine and N-methylpiperazine), and KCN and acetone cyanohydrin were employed.

In general, all molecules were prepared with moderate to excellent yields presenting well-defined melting points, and their structural elucidation was made using diverse spectroscopic techniques (FT-IR, GC-EM, ^{1}H NMR and ^{13}C NMR) (16). As positive controls of the analogues we used technical grade insecticides: Deltamethrin (99.5%-ChemService), pyrethroid used to control *Rhodnius prolixus* vectors in rural and peri-urban areas in Santander, and fenitrothion (98.0%-Dr. Ehrenstorfer), organophosphate used for vector control in Latin America. The essential oils of *C. flexuosus* (Poaceae) with geranial (37.5%), neral (28.2%) and geranyl acetate (10.0%) components; of *C. sinensis* (Rutaceae) with limonene (71.3%), linalol (5.4%), and beta-myrcene (5.0%), and of *E. citriodora* (Myrtaceae) with citronellal (49.3%), citronellol (13.0%), and isopulegol (12.9%) were donated by CENIVAM-UIS (17). All plants were collected in Santander. Following the protocol by Stashenko, *et al.* (18), we extracted and analyzed essential oils using microwave assisted hydrodistillation.

Exploratory doses

The exploratory doses used to evaluate each of the molecules were the following: for stage I nymphs, 25, 125, 500 mg.L^{-1}, and for stage V nymphs, 800, 1,000, 1,500 mg.L^{-1}); essential oils doses for stage I nymphs were 30, 300, 1,000 mg.L^{-1}, and for stage V nymphs, 2,000, 2,800, 3,500 mg.L^{-1}, which were used for the negative controls with acetone as solvent in all dilutions. The doses for the positive controls were deltamethrin (0.3, 0.7 and 500 mg.L^{-1}) and fenitrothion (0.09, 0.1 and 500 mg.L^{-1}) for stage I nymphs, and deltamethrin (1.0, 3.0 and 800 mg.L^{-1}) and fenitrothion (0.45, 0.5 and 800 mg.L^{1}) for stage V nymphs.

Topical application

We used a modified protocol (19) where nymphs were treated topically with the 12 synthetic girgensohnine analogues, the three essential oils and the

two commercial insecticides diluted in acetone and applied with a Hamilton 5 and 25 µl microsyringe fitted with a repetitive discharger. We applied the treatments on tergites and sternites of each stage I and stage V nymphs by applying 0.1 and 0.5 µl of the experimental dose, respectively. We designed the experiments for the bioassay with arthropods (20). We repeated all doses four times with 12 insects per replicate, while the complete bioassay was replicated on three different days. After treatment, we placed the nymphs in 1/2 oz. plastic cups with folded paper inside and covered with perforated lids that would allow the nymphs to breathe. Mortality was recorded 2, 12, 24, 48 and 72 h following treatment.

Exposure to treated surfaces

The experiments followed the protocol (19) with modifications. We used the experimental doses in 6 cm Petri dishes provided with filter disks (Munktell) and we impregnated their surfaces evenly with a micropipette following a spiral pattern from the center toward the outside. A volume of 437 µl of the solution was used, calculated according to the protocol. After drying the impregnated surfaces, 12 nymphs were exposed per dose, i. e., 48 nymphs per bioassay, covering the Petri dishes with perforated cling wrap. Mortality was recorded 0.5, 1, 2, 12, 24, 48 and 72 h following treatment.

Lethal dose bioassays

We chose the molecule with the highest percentage of insecticidal activity from among all the molecules evaluated (synthetic analogues and essential oils) in stage I and stage V *R. prolixus* nymphs. Based on these results, we conducted bioassays with multiple asymmetrical doses whose dose-response mortality results were used to determine the LD_{50} and LD_{95} values.

Statistical analysis

We evaluated dose-response mortality data from each bioassay using the Kolmogorov-Smirnov test; the normality value indicated a non-normal distribution of the data. We analyzed the results using Kruskall-Wallis (KW) and Mann-Whitney (MW) non-parametric tests, with p values <0.05 considered as significant; we used multiple-comparisons tests when data were significantly different. For the molecule with the highest mortality rate, probit analyses were conducted to determine the statistical parameters, lethal doses (LD_{50} and LD_{95}) and their respective confidence intervals. The statistical programs used were Statistics, v11, and Probit (21,22).

Ethics statement

The study was approved by the Ethics Committee of CEINCI-UIS, minute N° 12 of May 23, 2014.

Results

The synthesized analogues and essential oils induced differentiated mortality in nymph stages at 72 h in all experiments.

Evaluation of girgensohnine analogues in stage I R. prolixus nymphs

We observed insecticidal activity in 11 analogues when we used the topical application on tergites, in 12 on sternums and in six on treated surfaces, with molecule 3 showing the highest mortality rate (figure 2). Among the analogues evaluated, the mortality in tergites was significantly different (Kruskal-Wallis: H (14 N=45)=36.51205 p=0.0009) (figure 2a). The topical application on sternites resulted in significantly low mortality (Kruskal-Wallis: H (14 N=45)=33.98065 p=0.0021) compared to tergites (table 1). The same effect was observed on treated surfaces (Kruskal-Wallis: H (14 N=45)=41.89138 p=0.0001) (figure 2c). As expected, positive (deltamethrin and fenitriothion) and negative controls (acetone) had 100% and 0% mortality rates, respectively (figure 2). When comparing the mortality rates in the two types of treatment, tergites and sternites, there were significant differences (Mann-Whitney, MW, p<0.05) in synthetic analogues 3, 5 and 12. When comparing the three types of treatment, MW p<0.05 differences were observed in six synthetic molecules (2, 3, 5, 6, 11 and 12), and molecule 3 showed the highest mortality rate in each of the treatments (table 1), with LD_{50} 225.60 $mg.L^{-1}$ and LD_{95} 955.90 $mg.L^{-1}$in topical application on tergites at 72 h and 500 $mg.L^{-1}$(table 2).

Evaluation of girgensohnine analogues in stage V R. prolixus nymphs

Mortality in stage V nymphs at 72 h and 1,500 $mg.L^{-1}$ was low and only evidenced in sternites with 11.1±9.6% for analogue 6 and 5.5±4.7% for analogues 3 and 7, registering significantly different action (Kruskal-Wallis: H (14 N=45)=36.64743 p=0.0008) (figure 3). There was no mortality with the topical application on tergites and surfaces treated with the 12 girgensohnine synthetic analogues.

Evaluation of essential oils in stage I and V R. prolixus nymphs

We observed insecticidal activity in stage I nymphs with *C. flexuosus* (11.1±4.8%) on sternites, and exposed to treated surfaces at 72 h and 1,000 $mg.L^{-1}$.

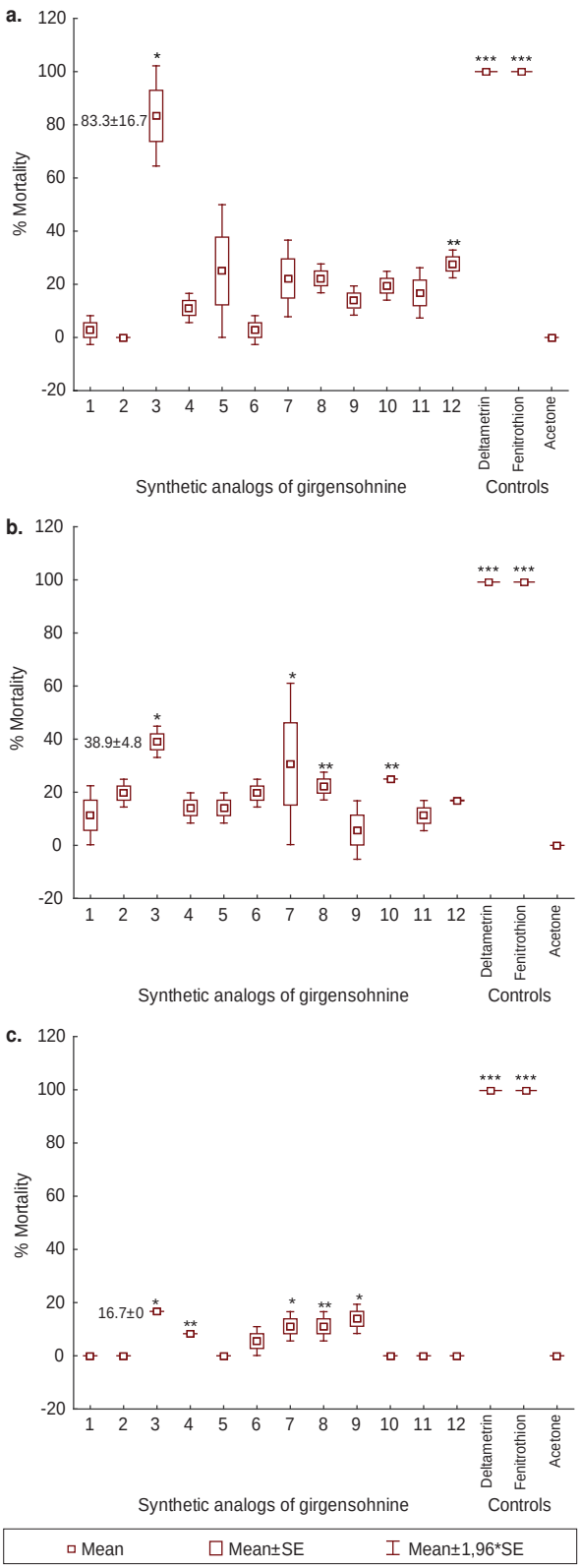


Figure 2. Insecticidal activity of each of the 12 synthetic analogues at 72 h and 500 mg.L-1 in stage I *Rhodnius prolixus* nymphs. **a.** Topical application on tergites. **b.** Topical application on sternites. **c.** Exposure to treated surfaces. *: Statistically significant values

However, with *C. sinensis* at the same dose, low mortality was evidenced in tergites (5.6±4.8%) and sternites (8.3±0%). For stage V nymphs the mortality was low (8.3±0%) and it was observed only with *C. sinensis* in tergites. On the other hand, we registered no mortality with the topical application of *C. sinensis* and *E. citriodora* on sternites nor with the exposure to treated surfaces (table 1).

Discussion

Girgensohnine analogues

Synthetic analogues are hydrophobic molecules that, when applied topically, can easily cross the exoskeleton of stage I nymphs, a property that may be responsible for the insecticidal activity observed both in tergites and sternites. Hydrophobic substances penetrate the insect cuticle more easily than hydrophilic substances because they are mostly made of lipids and waxes (23-25), which are more related to the substances evaluated in our study.

However, other intrinsic and extrinsic factors (size, age, nutritional state, humidity and temperature) (26-28) can change the evaluation of the molecules. Another fact to consider is cuticle sclerotization, as nymphs of 24 to 36 hours of age have semi-sclerotized cuticle and, thus, higher susceptibility (28). As other authors have mentioned,differences in cuticle thickness (29) in stage I and V nymphs can affect the susceptibility to external stimuli; for instance, Reyes, *et al.* (30), observed that the pyrethroid insecticides (beta-cypermethrin and fenitrothion) were more effective in stage I *T. dimidiata* and *T. maculata* nymphs than in stage V ones. Cáceres, *et al.* (31), found that stage I *R. pallescens* nymphs were sensitive to deltamethrin and lambda-cyhalothrin in different geographical zones. In another study, Germano found similar results (23) in toxicity bioassays with deltamethrin in different stages of development in *T. infestans.*

Insecticides penetrate insects until they reach their target in three ways: through the cuticle, by ingestion and by inhalation (26,32). Penetration occurs through the cuticle via articular and inter-segmental membranes, and through spiracles. We found the highest insecticidal activity for analogue 3 when it was evaluated on tergites of stage I nymphs, suggesting that penetration occurs through the thinner cuticle of this stage in dorsal, ventral and lateral positions (28,32). On stage V nymphs molecules penetration was observed only in sternites, with lower insecticide activity given cuticle characteristics in this nymphal stage.

Table 1. Mortality caused by the 12 synthetic analogues and three essentials oils applied using three types of treatment against stage I *Rhodnius prolixus* nymphs at 72 h and 500 mg.L^{-1}

Molecules	Tergite mortality (% ± SD)	Sternite mortality (% ± SD)	Mann-Whitney probability test (p<0.05)	Mortality from exposure to treated surfaces (% ± SD)	Kruskal-Wallis probability test (p<0.05)
1	2.8 ± 4.8	11.1 ± 9.6	0.238594	0	0.195
2	0	19.4 ± 4.8	1.000000	0	0.0457*
3	83.3 ± 16.7	38.9 ± 4.8	0.046302*	16.7 ± 0	0.0234*
4	11.1 ± 4.8	13.9 ± 4.8	0.238594	8.3 ± 0	0.195
5	25 ± 22	13.9 ± 4.8	0.046302*	0	0.0234*
6	2.8 ± 4.8	19.4 ± 4.8	1.000000	5.6 ± 4.8	0.0498*
7	22.2 ± 12.7	30.6 ± 26.7	0.512691	11.1 ± 4.8	0.5501
8	22.2 ± 4.8	22.2 ± 4.8	0.796254	11.1 ± 4.8	0.067
9	13.9 ± 4.8	8.3 ± 8.3	0.653095	13.9 ± 4.8	0.8599
10	19.4 ± 4.8	25 ± 0	0.113847	0	0.0289*
11	16.7 ± 8.3	11.1 ± 4.8	0.345779	0	0.0446*
12	27.8 ± 4.8	16.7 ± 0	0.043115*	0	0.0226*
C. flexuosus	0	11.1 ± 4.8	--	11.1 ± 4.8	0.0457*
C. sinensis	5.6 ± 4.8	8.3 ± 0	--	0	0.0608
E. citriodora	0	0	--	0	--
Acetone	0	0	--	0	--

% ± SD: Mortality rate and deviation; *: Statistically significant value

Table 2. Lethal doses LD_{50} and LD_{95} (mg.L^{-1}) of the molecule with the highest insecticidal activity (molecule 3) at 72 h in stage I *Rhodnius prolixus* nymphs and positive controls

Topical application on tergites	LD_{50}	LD_{95}	χ^2
Alpha-aminonitriles	225.60 (194.38-257.97)	955.9 (729.31-1443.64)	1.88
Deltametrin*	0.001* (4×10^{-4} - 5×10^{-3})	0.01* (2×10^{-2} - 4×10^{-2})	
Fenitrothion*	24* (20 - 36)	110* (100 - 260)	

Confidence intervals of 95% (in parentheses)
LD_{50}: Lethal dose causing mortality to 50% of the nymphs exposed to treatment; LD_{95}: Lethal dose causing mortality to 95% of the nymphs exposed to treatment; * χ^2: Chi square; LD_{50} and LD_{95} of deltamethrin and fenitrothion used in the study conducted by Vivas, *et al*.

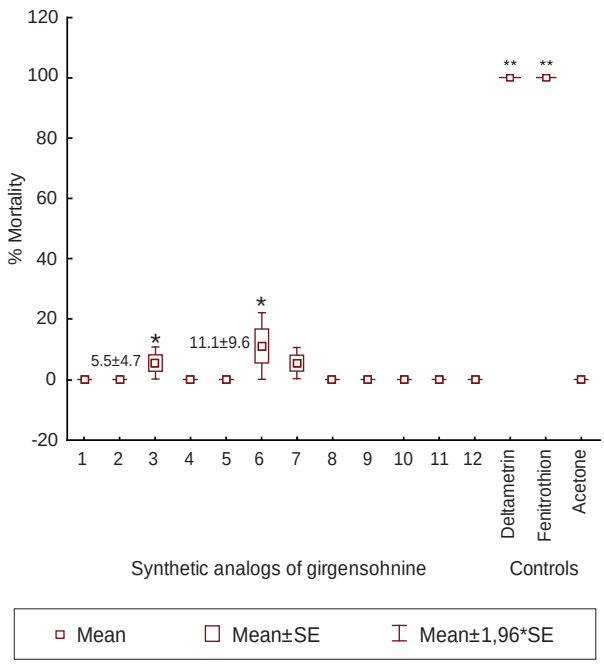


Figure 3. Insecticidal activity of each of the 12 synthetic analogues at 72 h and 1500 mg.L^{-}1 in stage V *Rhodnius prolixus* nymphs using topical application on sternites
*: Statistically significant values

Synthetic analogues are non-volatile compounds that, when dissolved in a volatile solvent such as acetone, allow the formation of crystals, leaving residues in porous substrates such as filter paper. In some field studies (33-35), authors have explained the lack of persistence of substances on some porous surfaces by the fact that these surfaces retain particles, thus reducing their availability and insect-substance interaction. This may have occurred in the experiment with the Petri dishes in our study, as the insecticidal activity of the synthetic analogues on the exposed surfaces resulted in lower mortality rates. In this sense, Stampini, *et al.* (36), have suggested increasing the dose of the active ingredient when used on porous surfaces.

Another factor that influenced the bioactivity of the synthetic analogues was the behavior observed in stage I nymphs: they moved toward the end of the paper, where they remained throughout the bioassay, which could have decreased their interaction with the molecules.

Although the insecticidal activity of synthetic alkaloids of girgensohnine on triatomines has not yet been reported in literature, Carreño, *et al.* (16), reported the insecticidal activity of these analogues against *Aedes aegypti*, one of dengue vectors, with analogue 1 showing the highest insecticidal activity on larvae at stages III and IV. In our study, the highest insecticidal activity and mortality rates were observed for analogue 3. The LD_{50} and LD_{95} of the best molecule were high in comparison with those observed by Vivas, *et al.* (37), with deltamethrin and fenitrothion in susceptible strains of *R. prolixus* from Venezuela (table 2).

Essential oils

Low insecticidal activity of essential oils on tergites and sternites was probably due to the volatility of some of their components, which, therefore, were washed away easily by acetone in its process of evaporation following topical application, thus diminishing their bioactivity. This was also the case in the assay with treated surfaces, in which the concentration of the active compounds in the Petri dish decreased.

Some authors have compared the insecticidal activity of the topical application with the exposure to surfaces impregnated with different essential oils, and they have reported low activity with the two methods. Fournet, *et al.* (38), found *Minthostachys andina* and *Hedomeam andonianum* (Lamiaceae) essential oils showed low or null insecticidal activity at 72 h in stage I and V *R. neglectus* and *T. infestans* nymphs after topical application and exposure to treated surfaces.

According to Sfara, *et al.* (14), there was low insecticidal activity in exposure to surfaces treated with five essential oils and seven monoterpenes in stage I *R. prolixus* nymphs as compared with the organophosphate insecticide used as positive control. Although the essential oils evaluated in stage I nymphs showed low insecticidal activity by contact (topical application on sternites and tergites) and exposure to surfaces (fumigant effect), when ingested mortality was much higher, as has been observed in other insects. According to Hincapié, *et al.* (39), the extracts of *Annona miricata* (Anonaceae) seeds on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) are more effective when ingested than by contact. Ringuelet, *et al.* (40), observed that *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oil showed greater insecticidal activity on *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) when applied on the grain, than when using the impregnation method on filter paper.

However, some authors have reported sublethal effects of essential oils on triatomines. For instance, Lutz, *et al*. (41), found repellent activity of some monoterpenes, methyl acetate and geraniol components of essential oils in stage V *R. prolixus* nymphs. The same results were reported by Zamora, *et al.* (42), as well as an anti-feeding effect caused by the main components of *Cymbopogon winterianus* (Poaceae) essential oil on three endemic species of triatomines in Arizona.

In summary, analogues of the girgensohnine alkaloid synthesized using a modified Strecker reaction showed insecticidal activity in *R. prolixus* nymphs. The analogue that showed the greatest insecticidal activity under laboratory conditions was molecule 3, with LD_{50} 225.60 $mg.L^{-1}$ and LD_{95} 955.90 $mg.L^{-1}$ in stage I nymph tergites. We observed low or no insecticidal activity in stage V nymphs with the molecules evaluated. *Cymbopogon flexuosus* and *C. sinensis* essential oils insecticidal effect was observed only in stage I nymphs, but with low activity.

Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Elena E. Stashenko for providing the essential oils, and for their chromatographic analysis.

Conflicts of interest

None declared.

Financing

This work received financial support from the *Patrimonio Autónomo*, *Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia*, *Francisco José de Caldas*, Colciencias (contract 624/2014) and the *Vicerrectoría de Investigación* of *Universidad Industrial de Santander*-UIS (project 1389).

References

1. **Justi AS, Russo CA, Mallet JR, Obara MT, Galvão C.** Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae). Parasit Vectors. 2014;7:149. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-149
2. **Mougabure-Cueto G, Picollo MI.** Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. Acta Trop. 2015;149:70-85. https://doi.org/10.1016/j.actatropica
3. **Roca-Saumell C, Soriano-Arandes A, Solona-Díaz L, Gascón-Brustenga J, Grupo Concenso Chagas APS.** Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. Aten Primaria. 2015;47:308-17. https://doi.org/10.1016/j.aprim.2015.01.002
4. **World Health Organization.** Chagas disease (American Trypanosomiasis). Accessed: March 18, 2016. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#

5. **Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, Baylón-Pacheco L, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA, *et al.*** Chagas disease (American trypanosomiasis) in México: An update. Acta Trop. 2013;127:126-35. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.007

6. **Justi SA, Galvão C.** The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. Trends Parasitol. 2017;33:42-52. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.002

7. **Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F.** Los vectores de la enfermedad de Chagas. Brussel: Koninklijke Academie Voor Overzeese Wetenschappen; 2002. p. 189.

8. **Salazar-Schettino M, Rojas-Wastavino G, Bucio-Torres M, Martínez-Ibarra J, Monroy-Escobar M, Vences-Blanco M, *et al.*** Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas en México. Journal of the Selva Andina Research Society. 2010;1:57-80.

9. **Palmezano JM, Plazas LK, Rivera KE, Rueda VP.** Enfermedad de Chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. Rev Médica UIS. 2015;28:81-90.

10. **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Chagas. Accessed: August 29, 2015. Available from: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Chagas.pdf.

11. **Guhl F.** Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. Rev Biomed. 2009;20:228-34.

12. **Maestre-Serrano R, Eyes-Escalante M.** Actualización de la presencia y distribución de triatominos en el departamento del Atlántico-Colombia: 2003-2010. Bol Mal Salud Amb. 2012;52:125-8.

13. **Parra-Henao GJ, Martínez MF, Angulo-Silva VM.** Vigilancia de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Colombia. Bogotá: Colciencias-Red Chagas; 2013. p. 127.

14. **Sfara V, Zerba EN, Alzogaray RA.** Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. J Med Entomol. 2009;46:511-5. http://www.bioone.org/doi/full/10.1603/033.046.0315

15. **Moretti AN, Zerba EN, Alzogaray RA.** Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 monoterpene alcohols. J Med Entomol. 2013;50:1046-54. https://doi.org/10.1603/ME12248

16. **Carreño-Otero AL, Vargas-Méndez LY, Duque-Luna JE, Kouznetsov VV.** Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girgensohnine analogues on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. Eur J Med Chem. 2014;78:392-400. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.067

17. **Vera SS, Zambrano DF, Méndez-Sánchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko EE, Duque-Luna JE.** Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2014;113:2647-54. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3917-6

18. **Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR.** Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. J Chromatogr A. 2004;1025:93-103. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.058

19. **Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas.** Monitoreo de la resistencia a insecticidas en Triatominos en América Latina. Anexo II: Protocolo de evalución efecto insecticida de *Rhodnius prolixus.* Accessed: March 17, 2017. Available from: https://www.mundosano.org/download/bibliografia/Monografia%201.pdf.

20. **Robertson JL, Savin NE, Russell RM, Preisler HK.** Bioassays with arthropods. Second edition. Boca Ratón: CRC Press; 2007. p. 224.

21. **Finney DJ.** Probit Analysis. 3rd edition. New York: Cambridge University Press; 1971. p. 333.

22. **Raymond M.** Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol. 1985;23:117-21.

23. **Germano MD.** Herencia y efectos demográficos de la resistencia a deltametrina en *Triatoma infestans*.Tesis. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2012. Accessed: August 24, 2015. Available from: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5316_Germano.pdf.

24. **Hadaway AB.** Some factors affecting the distribution of rate of action of insecticides. Bull World Heal Organ. 1971; 44:221-4.

25. **Juárez MP, Fernández GC.** Cuticular hydrocarbons of triatomines. Comp Biochem Physiol Part A, Mol Integr Physiol. 2007;147:711-30. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006. 08.031

26. **Zerba EN, de Licastro SA, Wood EJ, Picollo-de Villar MI.** Modo de accion de insecticida en *T. infestans*. En: Carcavallo T, Rabinovich JE, Tonn RJ, editores. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Tomo II. Párasitos-Reservorios-Control-Situación regional. Buenos Aires: OPS, OMS, Ministerio de Salud y Acción Social de la República de Argentina; 1985. p. 310-8.

27. **Moretti AN.** Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre vectores de Chagas y su posible uso como herramientas de control. Tesis. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2015. Accessed: March 20, 2017. Available from: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5773_Moretti.pdf.

28. **Alzogaray RA.** Caracterización de la tocixidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug). Tesis. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 1996. Accessed: September 12, 2015. Available from: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2815_Alzogaray.pdf.

29. **Busvine JR.** A critical review of the techniques for testing insecticides. London; Imprint unknown; 1971. p. 345.

30. **Reyes M, Angulo VM, Sandoval CM.** Efecto tóxico de β-cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). Biomédica. 2007;27(Supl.1): 75-82. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.250

31. **Cáceres L, Rovira JR, Calzada J, Saldaña A.** Evaluación de la actividad tóxica de los insecticidas piretroides deltametrina y lambdacihalotrina en dos poblaciones de campo de *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) de Panamá. Biomédica. 2011;31:8-14. https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.330

32. **Sugiura M, Horibe Y, Kawada H, Takagi M.** Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids. Pestic Biochem Physiol. 2008;91:135-40.

33. **Sandoval CM.** Monitoreo de la resistencia a insecticidas en triatominos en América Latina. Actividad insecticida del malatión y la deltametrina en una cepa colombiana de *Rhodnius prolixus* (Hemimptera: Reduviidae). Accessed: August 10, 2015. Available from: https://www.mundosano.org/download/bibliografia/Monografia%201.pdf.

34. **Rojas-de Arias A, Lehane MJ, Schofield CJ, Fournet A.** Comparative evaluation of pyrethroid insecticide formulations against *Triatoma infestans* (Klug): Residual efficacy on four substrates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:975-80. https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700020

35. **Palomino M, Villaseca P, Cárdenas F, Ancca J, Pinto M.** Eficacia y residualidad de dos insecticidas piretroides contra *Triatoma infestans* en tres tipos de viviendas. Evaluación de campo en Arequipa, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2008;25:9-16.

36. **Stampini M, Girgenti P, Locatelli DP.** Activity of deltamethrin on different surfaces against *Plodia interpunctella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae). Accessed: August 10, 2015. Available from: http://www.icup.org.uk/reports/icup884.pdf.

37. **Vivas AS, Fernández DM.** Toxicidad de cinco insecticidas en una cepa de laboratorio de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) de Venezuela. Entomotropica. 2001;16:187-90.

38. **Fournet A, Rojas-de Arias A, Charles B, Bruneton J.** Chemical constituents of essential oils of *muña*, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. J Ethnopharmacol. 1996;52:145-9.

39. **Hincapié-Llanos CA, Lopera-Arango D, Ceballos-Giraldo M.** Actividad insecticida de extractos de semilla *Annona miricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera:Curculionidae). Rev Colomb Entomol. 2008;34:76-82.

40. **Ringuelet JA, Ocampo R, Henning C, Urrutia MI.** Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst. en granos de trigo (Triticum aestivum L.). Rev Bras Agroecol. 2014;9:214-22.

41. **Lutz A, Sfara V, Alzogaray RA.** Repellence produced by monoterpenes on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae) decreases after continuous exposure to these compounds. J Insect Sci. 2014;14:254. https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu116

42. **Zamora D, Klotz EA, Meister EA, Schmidt JO.** Repellency of the components of the essential oil, Citronella, to *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, and *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J Med Entomol. 2015;52:719-21. https://doi.org/10.1093/jme/tjv03

Biomédica 2017;37(Supl.2):59-66
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3471

ARTÍCULO ORIGINAL

Distribución espacial de criaderos positivos y potenciales de *Aedes aegypti*

Daniel Elías Cuartas[1], Genny Martínez[2], Diana María Caicedo[1], Jhonny Garcés[1], Yoseth Ariza-Araújo[3], Miguel Peña[4], Fabián Méndez[1]

[1] Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional, Universidad del Valle, Cali, Colombia
[2] Secretaría de Salud Pública Municipal, Cali, Colombia
[3] Grupo de Investigación Biomédica, Universidad Icesi, Cali, Colombia
[4] Grupo de Saneamiento Ambiental, Instituto CINARA, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introducción. La distribución espacial de *Aedes aegypti* es heterogénea, y la interacción entre criaderos positivos y potenciales en el intradomicilio y el extradomicilio es uno de los aspectos más difíciles de caracterizar en los programas de control vectorial.
Objetivo. Describir la relación espacial entre los criaderos potenciales y positivos de *A. aegypti* en el intradomicilio y en el extradomicilio en un sector de Cali, Colombia.
Materiales y métodos. Se hizo una encuesta entomológica con el objetivo de recolectar datos de los criaderos en el intradomicilio y el extradomicilio. El análisis exploratorio de los datos espaciales incluyó la localización, la tendencia espacial, la autocorrelación espacial local, la continuidad espacial y la correlación espacial de los criaderos positivos y potenciales según el hábitat.
Resultados. Se determinaron las tendencias espaciales. Mediante el análisis de autocorrelación espacial local se ubicaron los conglomerados de criaderos potenciales y positivos del extradomicilio. Se encontró una correlación positiva entre los criaderos potenciales y los positivos y una correlación negativa entre el intradomicilio y el extradomicilio.
Conclusiones. La relación espacial entre criaderos positivos y potenciales de *A. aegypti* en el intradomicilio y el extradomicilio es dinámica y muy sensible a las características de cada territorio, por lo que establecer su distribución en el espacio contribuye a la priorización de recursos y acciones en los programas de control vectorial.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, dengue, Zika, chikungunya, análisis espacial.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3471

Spatial distribution of potential and positive *Aedes aegypti* breeding sites

Introduction: The spatial distribution of *Aedes aegypti* is heterogeneous, and the interaction between positive and potential breeding sites located both inside and outside homes is one of the most difficult aspects to characterize in vector control programs.
Objective: To describe the spatial relationship between potential and positive breeding sites of *A. aegypti* inside and outside homes in Cali, Colombia.
Materials and methods: We conducted an entomological survey to collect data from both indoor and outdoor breeding sites. The exploratory analysis of spatial data included location, spatial trends, local spatial autocorrelation, spatial continuity and spatial correlation of positive and potential breeding sites according to habitat.
Results: Spatial trends were identified, as well as clusters of potential and positive breeding sites outdoors using local spatial autocorrelation analysis. A positive correlation was found between potential and positive breeding sites, and a negative correlation existed between indoor and outdoor sites.
Conclusions: The spatial relationship between positive and potential *A. aegypti* breeding sites both indoors and outdoors is dynamic and highly sensitive to the characteristics of each territory. Knowing how positive and potential breeding sites are distributed contributes to the prioritization of resources and actions in vector control programs.

Key words: *Aedes aegypti*, dengue, Zika, Chikungunya, spatial analysis.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3471

Contribución de los autores:
Daniel Elías Cuartas, Miguel Peña y Fabián Méndez: diseño del estudio, análisis e interpretación de los datos
Genny Martínez y Yoseth Ariza-Araújo: diseño del estudio y recolección de información
Diana María Caicedo, Yoseth Ariza-Araújo y Jhonny Garcés: análisis e interpretación de los datos
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

El dengue, el Zika y el chikungunya son enfermedades infecciosas causadas por arbovirus (1-3) y transmitidas por dípteros del género *Aedes* (4). La complejidad de la transmisión de estas enfermedades (5-7) supera los aspectos biológicos de la interacción entre mosquitos y seres humanos, e involucra factores determinantes, como el ambiente urbano, los comportamientos individuales y grupales de los habitantes de las ciudades y las formas particulares de organización de los servicios de control y prevención.

Según la Organización Panamericana de la Salud (8), el control entomológico de las poblaciones del mosquito es de primordial importancia e involucra la fumigación periódica y la eliminación de criaderos positivos y potenciales en el marco de los programas de control y prevención. Los criaderos positivos son aquellos que tienen pupas o larvas y, los criaderos potenciales, aquellos que, a pesar de no contener pupas o larvas, tienen la capacidad de retener agua y, por su localización en el interior de la vivienda o en sus alrededores, son de fácil acceso para la oviposición de las hembras de *A. aegypti*.

Cali es la tercera ciudad más importante de Colombia y un lugar de transmisión hiperendémica del dengue, a lo cual se añade ahora el surgimiento del Zika y el chikungunya. Los sumideros (alcantarillas) de la ciudad son el principal criadero positivo y potencial de *A. aegypti.* Estas estructuras urbanas de manejo y control de las aguas lluvia, han sido colonizadas por *A. aegypti* y pueden aportar entre 40 y 495 pupas por manzana, lo que, sumado a los criaderos situados en el intradomicilio, puede generar una población de mosquitos adultos que varía entre 45 y 555 individuos por manzana (9).

La combinación de factores ambientales y sociales hace que la distribución de la población de mosquitos no sea homogénea en tiempo y espacio; además, la interacción entre criaderos positivos y potenciales en el interior y exterior de las viviendas en un territorio específico constituye uno de los de aspectos más difíciles de caracterizar en el manejo y control de criaderos del vector.

Correspondencia:
Daniel Elías Cuartas, Calle 4B N° 36-140, edificio 118, oficina 215, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 554 2476; celular: (316) 326 8449
daniel.cuartas@correounivalle.edu.co

Recibido: 08/08/16; aceptado: 08/06/17

En este sentido, el presente artículo se propuso describir la relación espacial entre criaderos positivos y potenciales en el intradomicilio y en el extradomicilio a partir de un análisis exploratorio de datos espaciales y del análisis de correlación.

Materiales y métodos

Área de estudio

Cali tiene una población cercana a los 2,5 millones de habitantes y está a una altitud entre los 950 y 1.070 msnm en un valle interandino, con un ecosistema de bosque seco tropical, una temperatura promedio de 24,6 °C y pluviosidad promedio de 1.588 mm (10), condiciones ideales para *A. aegypti*.

Una de las áreas con mayor presencia de este vector se encuentra en el nororiente de la ciudad, en una zona con características particulares, pues se ubica en la desembocadura del río Cali en el río Cauca y cuenta con dos tipos de desarrollo urbano: el planificado, por un lado, y, por el otro, los asentamientos informales sobre farillones o 'jarillones' (diques o terraplenes que protegen la ciudad de inundaciones) de los ríos Cali y Cauca.

Para la recolección detallada de información, el área de estudio se dividió en dos sectores según sus características y la morfología urbana. El primer sector correspondió al área periurbana de conformación subnormal situada sobre los farillones de los ríos Cauca y Cali, los cuales se emplearon como límites para subdividir el área en dos subsectores y estos, a su vez, en 24 microáreas. El segundo sector correspondió a un área residencial planificada, que se subdividió en seis subsectores y 77 microáreas. Las microáreas de los dos sectores incluían entre una y seis manzanas (figura 1).

Recolección de la información

Para la recolección de información se definió como intradomicilio a todo el espacio de la puerta de acceso a la vivienda hacia adentro, y el extradomicilio como aquel ubicado de la puerta de acceso hacia afuera. En el caso del extradomicilio se hizo un único recorrido a lo largo de los 174 lados de las 101 microáreas establecidas. En el instrumento de observación diseñado, se registró la información relativa a la presencia de la vegetación que podía retener agua (árboles con axilas y bromelias), de sumideros, escombros, botaderos crónicos de basura, recipientes y llantas.

Para recolectar la información del intradomicilio, se desarrolló una única inspección entomológica en 846 viviendas (9,8 % de las viviendas del sector),

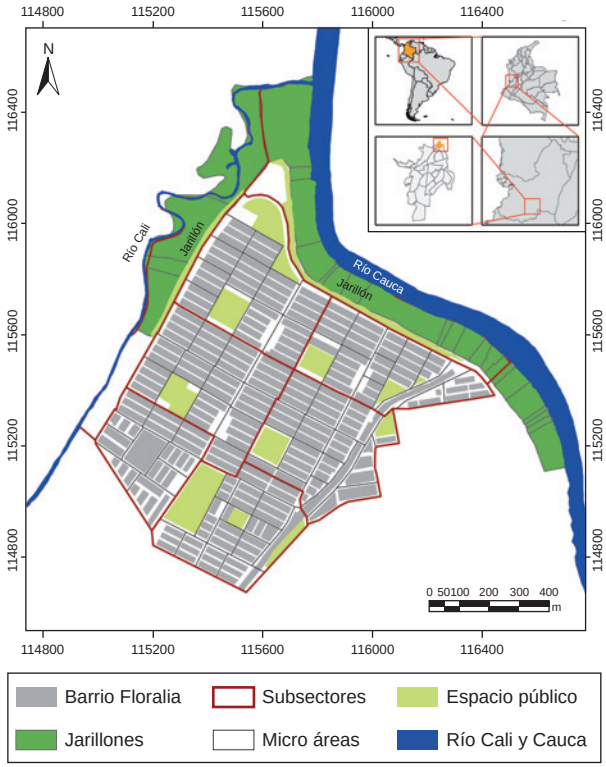


Figura 1. Área de estudio de la distribución espacial de *Aedes aegypti* en Cali, Colombia

de las cuales 87 (10,3 %) se localizaban en los farillones de los ríos Cali y Cauca. Las viviendas se seleccionaron por medio de un muestreo aleatorio sistemático a partir de un marco muestral finito conformado por 260 manzanas del área de estudio. En cada manzana se seleccionaron, al menos, tres viviendas, aunque en algunos sectores con mayor densidad de unidades residenciales se seleccionó un mayor número.

La detección de criaderos en el intradomicilio y el extradomicilio estuvo a cargo de personal capacitado en identificación morfológica de las formas del vector. Se siguió un proceso operativo estandarizado que establecía el uso de concentradores larvales en una única ocasión para depósitos pequeños, en tanto que, para recipientes grandes y sumideros, se empleó una red acuática de abertura rectangular en tres ocasiones con cinco minutos de intervalo. En la detección de las formas inmaduras se empleó la clave taxonómica de Forattini.

Análisis espacial

Mediante el sistema de información geográfica (SIG), se establecieron la localización, la distribución, la asociación y la interacción (11,12) de las cuatro variables de interés: criaderos positivos y potenciales en el intradomicilio, en el extradomicilio. Los datos de estas cuatro variables se agregaron en la unidad de análisis, es decir, la manzana.

Se calcularon los centroides (13) de cada manzana y, a partir de estos, se calculó un área de influencia (*buffer*) (14) de 100 m de radio alrededor de cada uno, como un valor intermedio entre el rango dado por el máximo valor de vuelo (160 m) y el valor promedio (56 m) (15). Una vez establecidas las zonas de influencia, se contaron todos los depósitos y sumideros positivos ubicados en ellas mediante una relación espacial de 'contenencia' (16), dato que se consideró como el correspondiente a los criaderos positivos en cada una de las manzanas (extradomicilio). Un procedimiento similar se siguió para el conteo de los depósitos y sumideros que no tenían pupas o larvas, los cuales se consideraron como criaderos potenciales del extradomicilio.

Se hizo un análisis de la tendencia espacial para describir el comportamiento de las variables en la unidad geográfica de análisis en el área de estudio (16-19). Para determinar la presencia de patrones espaciales en las variables, se hizo un análisis de autocorrelación espacial local para determinar el índice global de Morán, el cual indica la existencia de un patrón espacial a medida que se aproxima a 1, y el índice local de Morán, con el cual se examinó la presencia de conglomerados de valores extremos y se evaluó la significación estadística de la hipótesis sobre la disimilitud entre manzanas, y los valores extremos dentro de ella (18,20). Se empleó el programa GeoDa para el análisis (19) y, el ArcGis, para el mapeo.

Para describir la continuidad espacial de cada una de las variables, se emplearon técnicas geoestadísticas. Por tratarse de variables regionalizadas, se requirió un análisis univariado, uno bivariado y uno espacial para la detección y explicación de anomalías (21). Para determinar los cambios de cada una de las variables con respecto a la distancia, se empleó el semivariograma, cuyo fundamento es la primera ley de Tobler (22), la cual establece que "todo se relaciona con todo lo demás, pero las cosas cercanas están más relacionadas que las cosas distantes". La varianza entre pares separados por intervalos de distancia es la semivarianza (ŷ), calculada con la siguiente ecuación:

$$\hat{\gamma}(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} [z(x_i) - z(x_i)+h)]^2 \qquad (1),$$

donde $\hat{\gamma}(h)$ es la semivarianza para todas las muestras localizadas en el espacio separado por el intervalo de distancia h, $z(x_i)$ y $z(x_i + h)$ son los valores de la variable observados en los puntos de muestreo, y N (h) es el número total de pares de muestra separados por un intervalo de distancia h (23).

Una vez establecido el semivariograma, se calculó la superficie continua para cada una de las variables mediante el método *kriging*, técnica de interpolación que proporciona el mejor estimador lineal imparcial y estima la varianza de *kriging*, la cual depende del modelo de variograma obtenido y de las localizaciones de los datos originales, lo que permite un análisis de la calidad de las estimaciones. Se construyeron dos modelos con *cokriging*, variante que permite modelar varias variables simultáneamente (24-26): uno correspondiente a la potencialidad y otro a la positividad. Se hizo validación cruzada de cada modelo y se registraron la media de los errores de estimación, el error cuadrático medio y el error cuadrático medio adimensional (27). Por último, se hizo un análisis de correlación espacial con los modelos de cada una de las variables.

Resultados

En 86 % (223) de las 260 manzanas estudiadas, se detectó como mínimo un criadero positivo y, en 98 % (256) de ellas, uno potencial en el interior de las casas. De los 210 sumideros que se evaluaron como criaderos en el extradomicilio, en 23 % (48) se encontraron larvas o pupas de *A. aegypti*. Al calcular los sumideros potenciales y positivos en un área de 100 m alrededor de cada manzana con base en estos datos, se encontró que en 77 % (201) de las manzanas había, por lo menos, un criadero positivo en el extradomicilio y en 96 % (251), uno potencial.

En el análisis de tendencia espacial de cada una de las variables, no se evidenció una tendencia espacial de los criaderos positivos en el intradomicilio (figura 2A), pero sí una ligera tendencia a la concentración de las manzanas con criaderos potenciales cerca del farillón del río Cauca, especialmente aquellas con valores en el tercer y el cuarto cuartiles (figura 2B).

Por el contrario, en el caso de criaderos positivos en el extradomicilio, se observó una clara tendencia de ubicación hacia el occidente de la mayoría de las manzanas sin presencia de tales criaderos, o solo de algunas manzanas en el primer y segundo cuartiles, en tanto que en el oriente se concentró la mayoría de las manzanas en el tercer y cuarto cuartiles (figura 2C), en un patrón similar al de los criaderos potenciales en el extradomicilio, pero, en este caso, con tendencia a concentrarse en el centro del área de estudio (figura 2D).

Estas tendencias se comprobaron con el análisis de autocorrelación espacial local. En el interior de las viviendas, no se observó un patrón especial ni para los criaderos positivos ni para los potenciales (figura 3 A y B), pues el índice de Morán fue muy próximo a cero y, aunque algunas manzanas aparecieron como conglomerados con significación estadística, estaban aisladas y no presentaban un patrón espacial claro. En el extradomicilio, en cambio, los criaderos positivos y potenciales presentaron un patrón espacial dado por el índice de Morán (figura 3 C y D), lo cual se comprobó en el análisis de conglomerados al encontrar, en ambos casos, un conglomerado de manzanas con un gran número de criaderos rodeado de manzanas también con valores elevados, el cual resultó estadísticamente significativo.

Bajo el supuesto de que la distribución de criaderos es continua en el área de estudio, debido al rango de vuelo del mosquito, se obtuvieron superficies continuas para cada uno de los tipos de criaderos. En el caso de los criaderos positivos encontrados en el intradomicilio (figura 3A), se observó que los valores altos se presentaron en el occidente y el oriente del área de estudio y que, especialmente en el occidente, coincidieron con los valores elevados de los criaderos potenciales del intradomicilio (figura 3B) y los positivos del extradomicilio (figura 3C).

En contraste, las zonas con pocos criaderos potenciales en el exterior de las viviendas se ubicaron en áreas cercanas a los farillones, o sobre ellos, en las cuales no había servicio de acueducto ni alcantarillado y, por eso, no contaban con sumideros (figura 3D); allí se registró un considerable número de criaderos positivos y potenciales en el intradomicilio. Se observó, en cambio, una clara concentración de los criaderos positivos (figura 3C) en el extradomicilio en el occidente del área de estudio, lo cual coincidió con los conglomerados detectados en el análisis de autocorrelación espacial local.

El análisis de correlación espacial de los modelos de cada una de las variables evidenció una correlación positiva de 0,76 entre los criaderos positivos y potenciales en el intradomicilio. Hubo un comportamiento similar de los criaderos positivos y potenciales del extradomicilio, los cuales se correlacionaron positivamente, con un valor de 0,66.

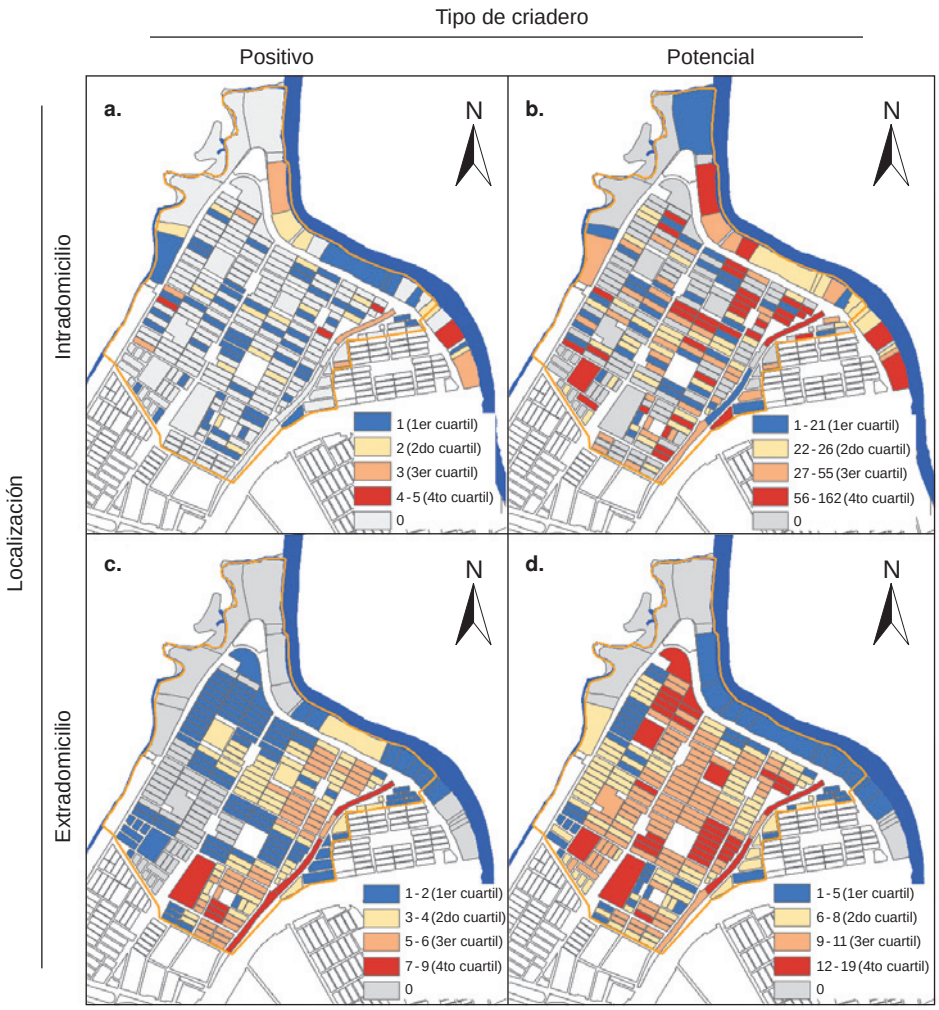


Figura 2. Análisis de la tendencia espacial de los criaderos positivos y potenciales de *Aedes aegypti*. **A.** Criaderos positivos en el intradomicilio. **B.** Criaderos potenciales en el intradomicilio. **C.** Criaderos positivos en el extradomicilio. **D.** Criaderos potenciales en el extradomicilio

Sin embargo, se observó una correlación negativa entre los criaderos del intradomicilio y los del extradomicilio (cuadro 1) (figura 4).

Discusión

La relación espacial de criaderos positivos y potenciales en el interior y el exterior de las viviendas es compleja y constituye un factor clave en el ciclo vital de *A. aegypti* que influye en la dinámica de la transmisión de las arbovirosis para las cuales sirve de vector. En el presente artículo se exploró la relación espacial entre criaderos positivos y potenciales en el intradomicilio y el extradomicilio y se estableció su correlación espacial. Con la información recolectada en el área de estudio, se determinó la presencia de patrones espaciales para los criaderos positivos y potenciales en el extradomicilio, así como la presencia de conglomerados de manzanas con un número elevado de criaderos. Se encontró una correlación espacial positiva entre los criaderos positivos y potenciales tanto en el interior como en el exterior de las viviendas, y una correlación espacial negativa entre estos dos hábitats.

Como lo demuestran los resultados, la clasificación y el análisis de los criaderos como potenciales y positivos permitieron obtener información útil para las acciones de control y prevención del dengue, lo cual se reforzó con el análisis de la distribución espacial según las categorías de intradomicilio y extradomicilio, pues se determinaron las áreas con una mayor concentración de criaderos por manzana, lo cual contribuye a una mejor comprensión de la dinámica de las relaciones ambientales en el comportamiento de esta infección (28).

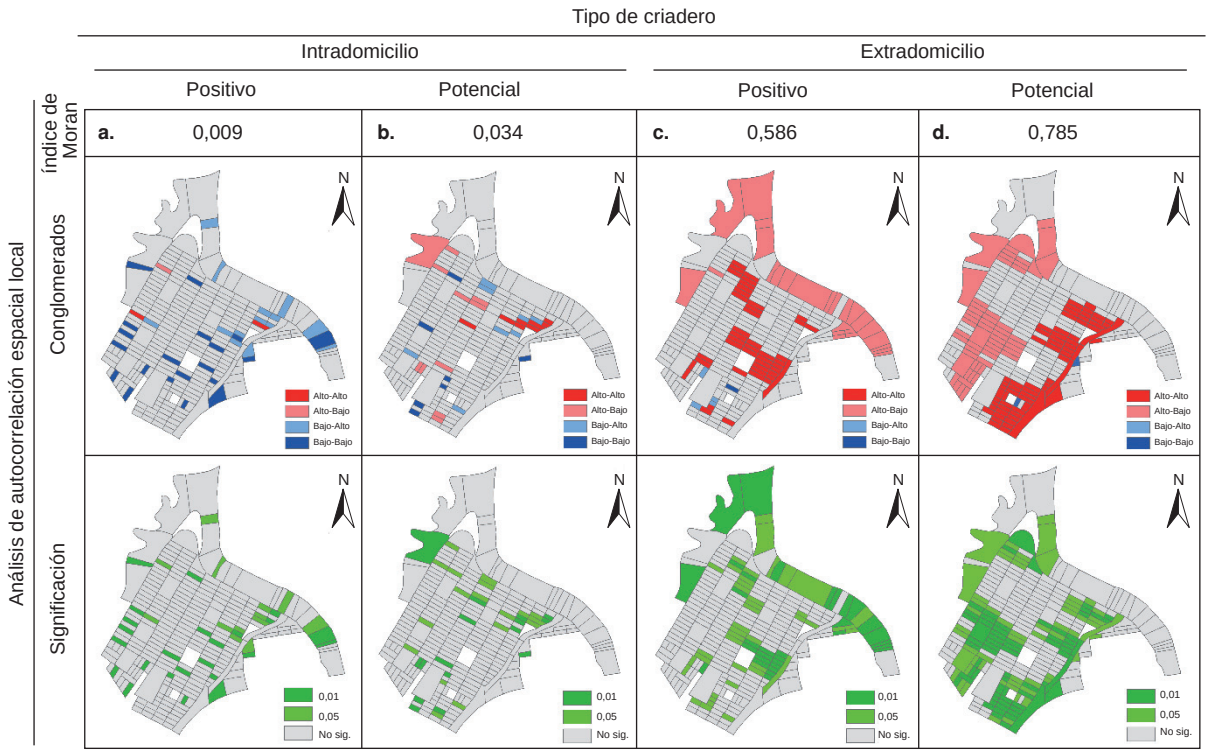


Figura 3. Autocorrelación espacial local y nivel de significación de la presencia de conglomerados de criaderos positivos y potenciales de *Aedes aegypti*. **a.** Criaderos positivos en el intradomicilio. **b.** Criaderos potenciales en el intradomicilio. **c.** Criaderos positivos en el extradomicilio. **d.** Criaderos potenciales en el extradomicilio

Cuadro 1. Correlación de la positividad y potencialidad de los criaderos de *Aedes aegypti* según el hábitat

Hábitat	Tipos de criaderos	Tipo de criadero			
		Intradomicilio		Extradomicilio	
		Potenciales	Positivos	Potenciales	Positivos
Intradomicilio	Potenciales	1,00	0,76	-0,45	-0,09
	Positivos	-	1,00	-0,69	-0,54
Extradomicilio	Potenciales	-	-	1,00	0,66
	Positivos	-	-	-	1,00

La presencia de conglomerados de manzanas con un gran número de criaderos positivos y potenciales en el extradomicilio, confirmó la importancia de los sumideros en la producción de larvas y adultos de *A. aegypti* (9,29,30). Además, la correlación positiva entre los dos tipos de criaderos en el extradomicilio sugiere una continua producción de mosquitos determinada por el posible relevo entre ellos, aspecto que no fue abordado en este estudio, pero que es necesario evaluar en futuras investigaciones.

Por otro lado, la correlación negativa entre los criaderos del intradomicilio y el extradomicilio se explicaría, en parte, por el efecto del control químico de los criaderos, el cual está rezagado en el tiempo (las características del extradomicilio en un tiempo t_1 afectan las del intradomicilio en un tiempo t_2). Asimismo, los criaderos tienen dos características: primero, pueden cambiar de positivos a potenciales y viceversa; y segundo, su capacidad de producción de pupas depende del volumen y las propiedades físicas y químicas del agua. Esta combinación de factores condiciona la productividad y su análisis puede brindar información sobre los criaderos con mayor o menor productividad (31). Los cambios en los tipos de criaderos y la productividad constituyen elementos que podrían explorarse en estudios posteriores mediante una regresión ponderada

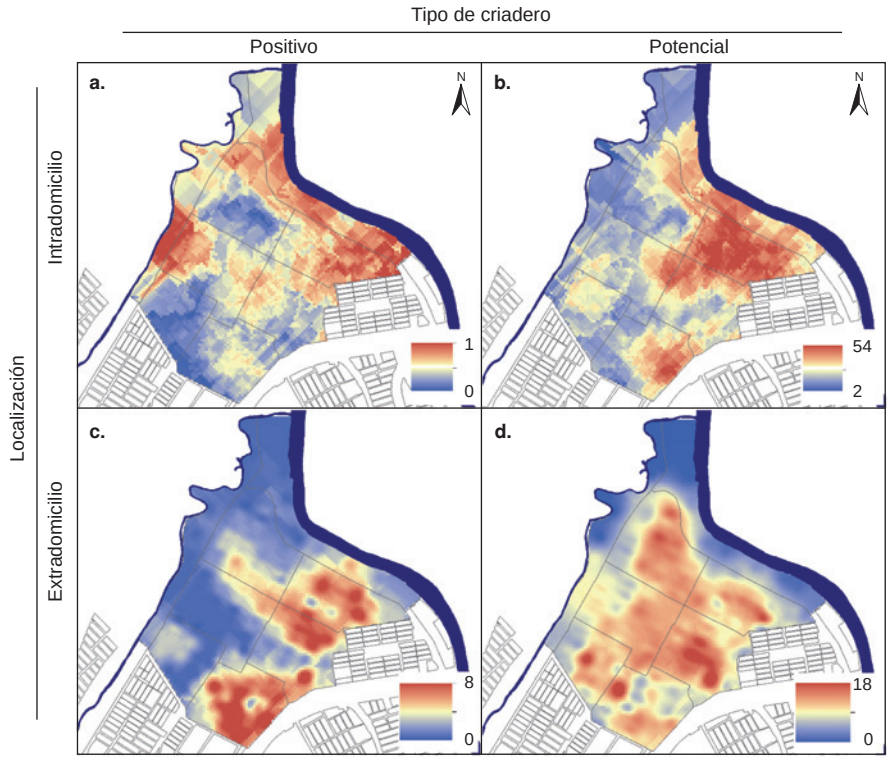


Figura 4. Continuidad espacial de los criaderos positivos y potenciales de *Aedes aegypti*. **a.** Criaderos positivos en el intradomicilio. **b.** Criaderos potenciales en el intradomicilio. **c.** Criaderos positivos en el extradomicilio. **d.** Criaderos potenciales en el extradomicilio

geográficamente para determinar la variabilidad espacial con la ayuda de múltiples regresiones locales basadas en los valores de las unidades espaciales (manzanas, barrios, comunas) (32,33).

Los sumideros son el principal criadero en el extradomicilio en Cali, lo cual contrasta con lo que sucede en otras ciudades, como Girardot, donde los principales criaderos son los tanques bajos y las albercas (34). Por ello, es necesario adelantar acciones intersectoriales para la implementación de sistemas innovadores de drenaje en las ciudades, de manera que no se conviertan en hábitat ideal para el mosquito (8). Asimismo, el poder de los análisis espaciales desarrollados en este estudio demuestra que las herramientas empleadas pueden fortalecer las capacidades locales para el control y la prevención del dengue.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses.

Financiación

El estudio fue financiado por el *International Development Research Centre* (IDRC) de Canadá y la Universidad del Valle.

Referencias

1. **Horstick O, Runge-Ranzinger S, Nathan MB, Kroeger A.** Dengue vector-control services: How do they work? A systematic literature review and country case studies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:379-86. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.027

2. **Fauci AS, Morens DM.** Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. N Engl J Med. 2016;374:601-4. https://doi.org/10.1056/NEJMp1600297

3. **Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, Strobel M.** Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Lancet Infect Dis. 2007;7:319-27. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X

4. **Cafferata ML, Bardach A, Rey-Ares L, Alcaraz A, Cormick G, Gibbons L, *et al*.** Dengue epidemiology and burden of disease in Latin America and the Caribbean: A systematic review of the literature and meta-analysis. Value Health Reg Issues. 2013;2:347-56. https://doi.org/10.1016/j.vhri.2013.10.002

5. **McLennan-Smith TA, Mercer GN.** Complex behaviour in a dengue model with a seasonally varying vector population. Math Biosci. 2014;248:22-30. https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.11.003

6. **Aguiar M, Kooi BW, Rocha F, Ghaffari P, Stollenwerk N.** How much complexity is needed to describe the fluctuations observed in dengue hemorrhagic fever incidence data? Ecological Complexity. 2013;16:31-40. https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2012.09.001

7. **Epstein PR.** Chikungunya fever resurgence and global warming. Am J Trop Med Hyg. 2007;76:403-4.
8. **Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.** Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz, Bolivia: OPS/OMS; 2010.
9. **González R, Gamboa F, Perafán O, Suárez MF, Lerma JM.** Experiencia de un análisis entomológico de criaderos de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en Cali, Colombia. Revista Colombiana de Entomología. 2007;33:9.
10. **Alcaldía de Santiago de Cali**. Cali en cifras 2011. Cali: Alcaldía de Santiago de Cali; 2012. p. 161.
11. **Buzai G.** Sistemas de información geográfica en geografía de la salud. En: Pickenhayn J, editor. Salud y enfermedad en geografía. Buenos Aires: Lugar Editores; 2008. p. 111-34.
12. **Palaniyandi M.** The environmental aspects of dengue and chikungunya outbreaks in India: GIS for epidemic control. International Journal of Mosquito Research. 2014;1:38-44.
13. **Deakin RE, Birda SC, Grenfellb RI.** The Centroid? Where would you like it to be? Cartography. 2002;31:153-67. https://doi.org/10.1080/00690805.2002.9714213
14. **Vine MF, Degnan D, Hanchette C.** Geographic information systems: Their use in environmental epidemiologic research. Environ Health Perspect. 1997;105:598-605.
15. **Muir LE, Kay BH.** *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. Am J Trop Med Hyg. 1998;58:277-82. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.277
16. **Ministerio da Saúde do Brazil, Fundaçao Oswaldo Cruz.** Introduçao à estadistística espacial para a saúde pública. Brasilia: Ministerio da Saúde; 2007.
17. **Cuartas D, Ariza Y, Pachajoa H, Méndez F.** Analysis of the spatial and temporal distribution of birth defects between 2004-2008 at a third-level hospital in Cali, Colombia. Colombia Médica. 2011;42:9-16.
18. **Coro C.** Análisis estadístico de datos geográficos en geomarketing: el programa GeoDa. Revista Distribución y Consumo. 2006;131:34-45.
19. **AnselinL, Syabri I, Kho Y.** GeoDa: An introduction to spatial data analysis. Geographical analysis. 2006;38:5-22. https://doi.org/10.1111/j.0016-7363.2005.00671.x
20. **Anselin L.** Local Indicators of Spatial Association-LISA. Geographical Analysis. 1995;27:93-115. https://doi.org/10.1111/j.1538-4632.1995.tb00338.x
21. **Isaaks EH, Srivastava RM.** An introduction to applied geostatistics. Oxford: Oxford University Press; 1989. p. 561.
22. **Tobler WR.** A computer movie simulating urban growth in the Detroit region. Economic Geographic. 1970;46:234-40.
23. **Gallardo A, Maestre F.** Métodos geoestadísticos para el análisis de datos ecológicos espacialmente explícitos. En: Maestre F, Alcántara A, Bonet A, editores. Introducción al análisis espacial de datos en ecología y ciencias ambientales: métodos y aplicaciones. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos; 2008. p. 216-72.
24. **Goovaerts P.** Ordinary cokriging revisited. Mathematical Geology. 1998;30:21-42. https://doi.org/10.1023/A:1021757104135
25. **Knotters M, Brus DJ, Oude Vosjaar JH.** A comparison of kriging, co-kriging and kriging combined with regression for spatial interpolation of horizon depth with censored observations. Geoderma. 1995;67:227-46. https://doi.org/10.1016/0016-7061(95)00011-C
26. **Childs C.** Interpolation surfaces in arcgis spatial analyst. ArcUser. 2004:32-5.
27. **Dávila JR, González J, Ocete R, López R.** Descripción estadística de la distribución espacial de los huevos del mosquito verde *Jacobiasca lybica* (Bergenin & Zanon) (Homoptera: Cicadellidae) en viñedo: modelización y mapeo. Bol SanVeg Plagas. 2002;28:87-95.
28. **Nyamah MA, Sulaiman S, Omar B.** Categorization of potential breeding sites of dengue vectors in Johor, Malaysia. Trop Biomed. 2010;27:33-40.
29. **Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE.** A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: Literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. Am J Trop Med Hyg. 1995;53:489-506. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.489
30. **Ocampo CB, Giraldo-Calderón GI, Pérez M, Morales CA.** Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali, Colombia. Biomédica. 2008;28:224-33. https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i2.93
31. **Barrera R.** Recomendaciones para la vigilancia de *Aedes aegypti*. Biomédica. 2016;36:454-62. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2892
32. **Fotheringham S, Charlton ME, Brunsdon C.** Geographically weighted regression: A natural evolution of the expansion method for spatial data analysis. Environ Plan A.1998;30:1905-27.
33. **Nakaya T, Fotheringham AS, Brunsdon C, Charlton M.** Geographically weighted Poisson regression for disease association mapping. Stat Med. 2005;24:2695-717.
34. **Alcalá L, Quintero J, González-Uribe C, Brochero H.** Productividad de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) en viviendas y espacios públicos en una ciudad endémica para dengue en Colombia. Biomédica. 2015;35:258-68. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2567

Biomédica 2017;37(Supl.2):67-76
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3470

ARTÍCULO ORIGINAL

Ensayos de sensibilidad de larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* frente al nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en condiciones de laboratorio

Carolina Ulvedal[1], María Alejandra Bertolotti[1], Susana Raquel Cagnolo[1], Walter Ricardo Almirón[2]

[1] Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina
[2] Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, CONICET, Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Introducción. *Aedes aegypti* es el vector de los virus del dengue, la fiebre amarilla, el Zika y el chikungunya, y *Culex quinquefasciatus*, de los virus de la encefalitis de Saint Louis y de la del Oeste del Nilo.
Objetivo. Evaluar la capacidad infecciosa de *Heterorhabditis bacteriophora* N4 en larvas de *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* en el laboratorio.
Materiales y métodos. Treinta larvas de segundo estadio de cada especie de mosquito se expusieron a diferentes dosis (0:1, 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 y 1.500:1) de ejemplares juveniles infectivos del nematodo. Se hicieron cuatro réplicas por dosis.
Resultados. El parasitismo varió entre 2,5 y 80 % en *C. quinquefasciatus* y entre 4,2 y 92,5 % en *A. aegypti*, con diferencias significativas entre las dosis (p<0,0001). Las DL_{50} fueron de 160,8 ejemplares juveniles infectivos por larva de *C. quinquefasciatus* y 113,6 por larva de *A. aegypti*; 4 a 6 % de los ejemplares juveniles infectivos llegaron a la fase adulta en *C. quinquefasciatus,* y 12 a 61 % en *A. aegypti*. Nuevos ejemplares juveniles infectivos aparecieron a partir de la dosis de 100:1. En *A. aegypti* aparecieron solo con dosis superiores a esta y, en *C. quinquefasciatus*, con una dosis de 1500:1. Se observó melanización de los ejemplares juveniles infectivos en las dos especies de mosquitos.
Conclusión. Se estableció la sensibilidad de estas especies de mosquitos al parasitismo producido por un aislamiento autóctono de *H. bacteriophora* en condiciones de laboratorio y su potencial efecto como agente de control biológico.

Palabras clave: *Aedes aegypti*; *Culex quinquefasciatus*; control biológico de vectores; nematodos.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3470

Laboratory susceptibility tests of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae to the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*

Introduction: *Aedes aegypti* is the vector of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya viruses, and *Culex quinquefasciatus* is the vector of St. Louis and West Nile encephalitis viruses.
Objective: To evaluate infectivity of *Heterorhabditis bacteriophora* N4 in *C. quinquefasciatus* and *A. aegypti* larvae under laboratory conditions.
Materials and methods: Thirty second-instar larvae of the two mosquito species were exposed each to different doses (0:1, 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 and 1,500:1) of nematode infective juveniles. Four replications per dose were performed.
Results: Parasitism varied between 2.5 and 80 % in *C. quinquefasciatus*, and between 4.2 and 92.5 % in *A. aegypti*, with significant differences between doses (p<0.0001). DL_{50} were: 160.8 infective juveniles per larva for *C. quinquefasciatus* and 113.6 infective juveniles per larva for *A. aegypti.* In *C. quinquefasciatus,* 4 to 6 % of the infective juveniles developed to adults and in *A. aegypti*, 12- 61 %. In *A. aegypti* the emergence of new infective juveniles occurred with 100:1, 500:1, 750:1 and 1,500:1 infective juveniles per larva, and in *C. quinquefasciatus,* with 1,500:1 infective juveniles per larva. Melanization of infective juveniles was observed in both mosquito species.

Contribución de los autores:
Carolina Ulvedal: cría de mosquitos, realización de pruebas, recolección y análisis de datos
María A. Bertolotti: multiplicación del nematodo
Susana R. Cagnolo: detección del aislamiento del nematodo utilizado y asesoría metodológica en las pruebas
Walter R. Almirón: dirección del trabajo
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Conclusion: The susceptibility of these mosquito species to parasitism of an indigenous isolate of *H. bacteriophora* in the laboratory was demonstrated. *Heterorhabditis bacteriophora* N4 could be an efficient biological control agent.

Key words: *Aedes aegypti*; *Culex quinquefasciatus*; pest control, biological; nematoda.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3470

Los mosquitos constituyen uno de los grupos de insectos de mayor importancia médica y veterinaria, pues sirven de vectores de agentes patógenos (1). *Aedes aegypti* (L) y *Culex quinquefasciatus* Say son dos de las especies más comunes en los ecosistemas urbanos y están estrechamente asociadas al hombre, quien les ofrece las condiciones adecuadas para su proliferación: refugio, criaderos y alimento.

Aedes aegypti se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, aunque también en zonas templadas (2). En Argentina, el mosquito es de amplia distribución: desde el norte del país hasta la provincia de Neuquén (3).

Entre los arbovirus presentes en Argentina y transmitidos por *A. aegypti*, pueden mencionarse los *Flavivirus* del dengue (DENV), la fiebre amarilla (YFV) y el Zika (ZIKV), y el *Alfavirus* del chikungunya (CHIKV); estos dos últimos circulan desde 2015 y 2016, respectivamente (4-7).

El dengue se presenta en zonas urbanas y semiurbanas, y en algunos países asiáticos y latinoamericanos; causa la forma grave de la enfermedad e incluso la muerte en menores (8). En el 2015 se notificaron 2.350.000 casos tan solo en la región de las Américas, de los cuales más de 10.200 se diagnosticaron como dengue grave y provocaron 1.181 defunciones. En Argentina, la reaparición del dengue se registra desde 1998. Según los datos epidemiológicos publicados en abril de 2016, en los últimos siete años los casos autóctonos se han incrementado en 70 % (9).

En cuanto a *C. quinquefasciatus*, este transmite el virus de la encefalitis de Saint Louis (SLEV), el cual se distribuye ampliamente en las Américas, y en Argentina abarca zonas subtropicales y templadas (10). Según los datos de las pruebas serológicas, la especie se ha detectado en provincias del centro y el noroeste, y en el sur hasta la provincia de Río Negro (11). Desde el 2002, se ha registrado su reaparición como agente etiológico de encefalitis en humanos en el cono sur del continente (11,12). En Argentina, el brote más grande ocurrió en la provincia de Córdoba en el 2005, con 48 casos y nueve defunciones. En el 2011 se produjo un brote en la ciudad de San Juan y, posteriormente, se registraron otros brotes en la provincia de Buenos Aires y en provincias del norte y del litoral se detectaron algunos casos aislados (13).

Culex quinquefasciatus también es transmisor del virus del Nilo Occidental (WNV) en Argentina (Bornancini V, Estallo E, Batallán G, Grech M, Visintín A, Frías-Céspedes M, *et al*. Variables ambientales satelitales y su relación con la abundancia de las especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) sanitariamente más importantes de la ciudad de Córdoba, Argentina. IX Jornadas Regionales de Mosquitos. Universidad Nacional del Nordeste. 4 - 5 de septiembre de 2014. Resistencia, Chaco); este virus se aisló por primera vez en nuestro país en el 2006, lo cual correspondió al primer registro en Suramérica (14). Durante el 2006 y el 2007, se detectaron casos humanos de encefalitis en los cuales se confirmó serológicamente el WNV como el agente etiológico (14).

El control de los mosquitos vectores implica el uso excesivo de sustancias químicas que, además del riesgo de toxicidad que supone para el ser humano y los animales, ha provocado la aparición de resistencia, la eliminación de los controladores naturales del vector y la contaminación del entorno (15). Por estas razones, en las últimas décadas se ha trabajado en la búsqueda de nuevos métodos de control que sean más seguros ambientalmente, entre ellos, el uso de agentes biológicos (15).

Los llamados nematodos 'entomopatógenos' son parásitos obligados de insectos. Su ciclo biológico incluye la fase de huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto. Únicamente los ejemplares juveniles infectivos, que corresponden al tercer estadio larval, se desarrollan fuera del insecto y sobreviven en el medio hasta que localizan un huésped (16,17). La presencia de un solo espécimen juvenil infectivo

Correspondencia:
Carolina Ulvedal, Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Avenida Vélez Sársfield 299 (5000), Córdoba, Argentina
Teléfono: (54) (351) 535 3800; fax: (54) (351) 433 2098
carolinaulvedal@gmail.com

Recibido: 02/08/16; aceptado: 21/06/17

dentro del huésped causa su muerte en las 48 horas posteriores al contacto mediante la liberación de una bacteria simbionte que transportan en su intestino. Dado su efecto letal, comparable al de un insecticida químico, constituyen una alternativa interesante como agentes de control biológico (16,18).

En Argentina y en otras regiones del mundo, se han llevado a cabo estudios para evaluar la actividad larvicida de los nematodos entomopatógenos contra *A. aegypti* (19,20) y *Culex pipiens* (21). En Argentina, las pruebas de parasitismo y capacidad infecciosa se han hecho con distintas especies autóctonas de nematodos y mosquitos (22,23). Se ha encontrado que *Steinernema rarum* (OLI) es un eficaz agente de control de larvas de *A. aegypti* (Cagnolo SR, Rivero ME, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae), en condiciones de laboratorio. Nematropica. 2007;37:142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina); contra *C. quinquefasciatus* (Cagnolo S, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* al parasitismo por *Steinernema rarum* (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. V Jornadas Regionales sobre Mosquitos. La Plata; 2007), y contra *C. apicinus* (24). Por su parte, *Heterorhabditis bacteriophora* N116 parasita larvas de *A. aegypti* (20). No se han hecho pruebas contra *C. quinquefasciatus* con ningún espécimen nativo del género *Heterorhabditis* y, si bien se conoce la sensibilidad de estos mosquitos al parasitismo, en algunos casos se ha observado la melanización del nematodo como reacción de defensa del insecto (20,21).

Aún hay mucho que explorar en este campo si se tienen en cuenta las diferencias intraespecíficas que pueden afectar la capacidad infecciosa de los nematodos entomopatógenos, y que estarían relacionadas con su comportamiento (25), con el insecto y con factores ambientales (26).

En este sentido, los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar y comparar los porcentajes de parasitismo y las DL_{50} de *H. bacteriophora* N4 en *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti*, y 2) constatar el desarrollo y la reproducción de los nematodos dentro de los insectos huéspedes con las diferentes dosis y determinar la aparición de la melanización como reacción inmunitaria de los insectos al parasitismo.

Materiales y métodos

Multiplicación del nematodo y dosis utilizadas

Se utilizó el aislamiento N4 de *H. bacteriophora*, detectado en el barrio Cerro de las Rosas de Córdoba, provincia de Córdoba, Argentina (Cagnolo SR, Carranza F. Ocurrence of entomopathogenic nematodos in private properties in Córdoba Capital City, Argentina. Nematropica. 2007;37:142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Dicho aislamiento se mantiene en cultivo permanente en la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

Para la multiplicación del nematodo, se emplearon técnicas convencionales y, como huéspedes auxiliares, se utilizaron larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) (27). En los experimentos se usaron especímenes juveniles infectivos que no superaban los 30 días de almacenamiento desde la fecha de aparición del huésped auxiliar.

Obtención de las larvas de mosquitos

Los ejemplares de *A. aegypti* se obtuvieron del Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba (CIEC) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba. La colonia se mantuvo en el laboratorio con las técnicas convencionales (28). Las hembras se alimentaron semanalmente en una rata *Rattus norvegicus*, procedimiento aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL (Resolución Nº. 571-HCD- 2014, Acta Nº 13– 2016), de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los ejemplares de *C. quinquefasciatus* utilizados también provenían del CIEC. En el marco de las actividades del programa de vigilancia de la encefalitis de Saint Louis en Córdoba, se recolectaron larvas de mosquitos en criaderos ubicados en distintos puntos de la ciudad, cuya especie se determinó en el laboratorio. Los ejemplares de *C. quinquefasciatus* se criaron bajo condiciones similares a las utilizadas para *A. aegypti*, excepto que las hembras se alimentaron en una codorniz *Coturnix coturnix*, procedimiento también aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL (Resolución Nº 571-HCD- 2014, Acta Nº 13 -2016) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

Experimentos de infección

Las infecciones se llevaron a cabo colocando 30 larvas de mosquito de segundo estadio en bandejas provistas de 80 ml de agua sin cloro y la cantidad adecuada de nematodos en dosis de 0:1, 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 y 1.500:1 especímenes juveniles infectivos por larva de mosquito. Dichas dosis se obtuvieron mediante las técnicas convencionales (27).

Se hicieron cuatro réplicas por dosis en cada especie de mosquito. Las bandejas se mantuvieron a una temperatura entre 25 y 28 °C, con alternancia de 12 horas en los períodos de luz y oscuridad. Las larvas de mosquito se alimentaron diariamente agregando al medio 0,25 mg de hígado en polvo por larva.

Cada 24 horas se hicieron observaciones bajo el estereomicroscopio para registrar la muerte de las larvas de mosquito. El período de observación se extendió hasta el estado de pupa. Las larvas muertas fueron transferidas individualmente a placas de 24 celdas (Falcon Nº 3047) y se siguió su evolución por siete días más, observando la transparencia de la cutícula, con el fin de registrar el desarrollo y la reproducción de los nematodos dentro del insecto huésped. Transcurridos los siete días, se disecaron los insectos muertos en cuyo interior no se observaron nematodos por transparencia para verificar si había parasitismo.

Con cada una de las dosis se registraron el número de larvas parasitadas, los estadios larvales en los que se observó parasitismo, el número total de nematodos en las larvas, el número de nematodos que alcanzaron el estado adulto, y los nematodos 'melanizados'. Se calculó la dosis letal 50 (DL_{50}) para cada especie de insecto.

Análisis de los datos

Para detectar diferencias significativas en las variables evaluadas, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (*Least Significant Difference*, LSD) de Fisher en cada especie. Cuando los datos no siguieron una distribución normal, se aplicó una transformación logarítmica ($\log_{10}(x+1)$). La DL_{50} se calculó tomando el logaritmo ($\log_{10}(x+1)$) de las dosis y los valores del análisis *probit* de las proporciones de mortalidad. Posteriormente, se hizo un análisis de regresión lineal. Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa InfoStat, versión 2013 (29).

Resultados

Parasitismo y dosis letal 50 (DL_{50}) en larvas de Culex quinquefasciatus y Aedes aegypti

En ambas especies de mosquitos, la mortalidad larval se detectó a las 24 horas del contacto. Los mayores porcentajes de mortalidad en *C. quinquefasciatus* se observaron entre el cuarto y el quinto día (22 y 24 %), y en *A. aegypti*, entre el segundo y el tercero (28 y 41 %) (figura 1).

Los valores de parasitismo oscilaron entre 2,5 y 80 % en *C. quinquefasciatus* y entre 4,2 y 92,5 % en *A. aegypti*, con las dosis de 1:1 y 1.500:1, respectivamente. En *C. quinquefasciatus* se registró mortalidad en todas las dosis y, a partir de la dosis de 100:1, los porcentajes superaron el 50 %. En *A. aegypti* no se registró muerte por nematodos con la dosis de 5:1 (figura 2). En ambas especies de mosquitos, los porcentajes de mortalidad se incrementaron a partir de la dosis de 100:1, registrándose diferencias significativas entre esta y las superiores

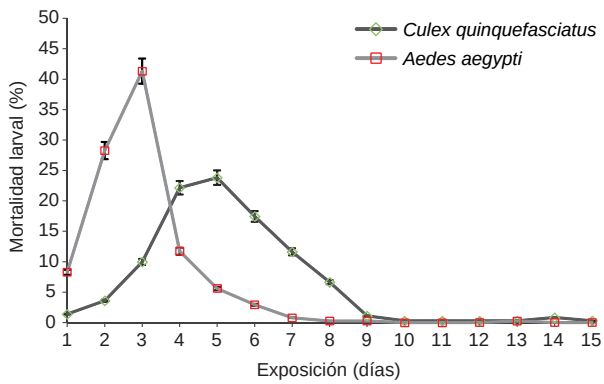


Figura 1. Evolución del parasitismo (± error estándar) en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en función de los días de exposición a las diferentes dosis de *Heterorhabditis bacteriophora* aplicadas

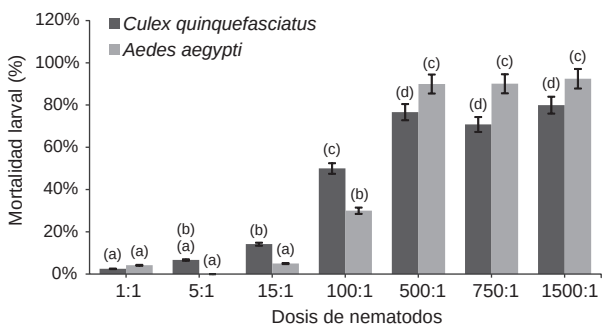


Figura 2. Porcentaje (± error estándar) de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en función de las dosis de nematodos aplicadas. Las letras en las barras indican diferencias significativas (p≤0,05).

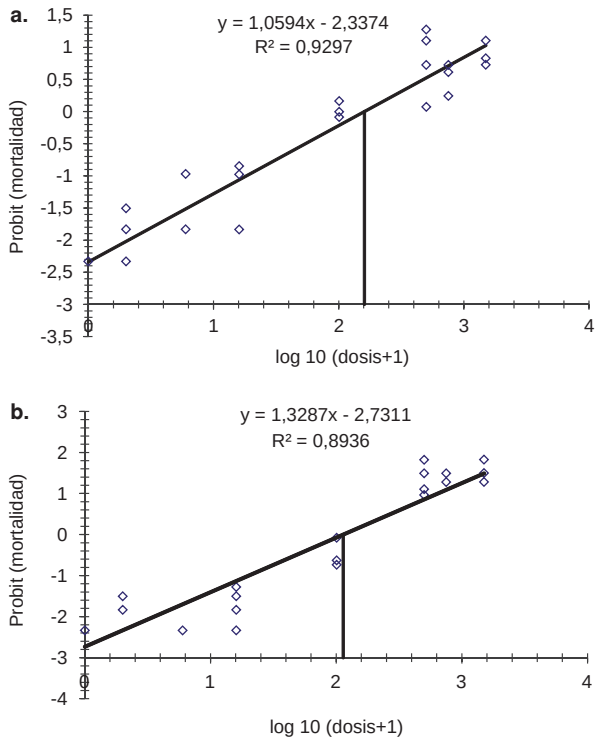


Figura 3. Dosis letal 50 de *Heterorhabditis bacteriophora.* **a.** *Culex quinquefasciatus*. **b.** *Aedes aegypti*

($F_{C.\ quinquefasciatus}$=82,77; gl=7; p<0,0001) ($F_{A.\ aegypti}$= 316,22; gl=7; p<0,0001) (figura 2). Los valores de DL_{50} fueron de 160,8 especímenes juveniles infectivos por larva para *C. quinquefasciatus* y de 113,6 especímenes juveniles infectivos por larva para *A. aegypti* (figura 3a y3b).

Parasitismo en los diferentes estadios larvales

En las dos especies de mosquitos, los estadios larvales II, III y IV resultaron parasitados por *H. bacteriophora* N4. Independientemente de la dosis aplicada, el tercer estadio presentó los porcentajes más altos de parasitismo, difiriendo significativamente de los estadios restantes ($F_{C.\ quinquefasciatus}$= 14,58; gl=2; p<0,0001) y ($F_{A.\ aegypti}$=12,58; gl=2; p<0,0001*)* (cuadro 1).

Desarrollo y reproducción de Heterorhabditis bacteriophora dentro de Culex quinquefasciatus y Aedes aegypti

El porcentaje de larvas parasitadas en las cuales se hallaron nematodos adultos fue mayor en *A. aegypti* que en *C. quinquefasciatus* (17 % *Vs.* 2 %). En esta última especie, solo se observaron nematodos adultos con la dosis de 1.500:1, en tanto que, en *A. aegypti*, se observaron con todas las dosis superiores a 5:1.

Las disecciones demostraron diferencias en el desarrollo de los nematodos según las dosis. En ambas especies se encontraron individuos adultos con dosis superiores a 5:1, y los valores más altos se registraron a partir de la dosis de 500:1 ($F_{C.\ quinquefasciatus}$=14,36; gl=7; p<0,0001) ($F_{A.\ aegypti}$=156,39; gl=7; p<0,0001) (cuadro 2). En *C. quinquefasciatus*, entre 4 y 6 % de los especímenes juveniles infectivos se desarrollaron a hembras hermafroditas y, en *A. aegypti*, entre 12 y 61 %.

Al final del ciclo parasitario, se constató la aparición de nuevos especímenes juveniles infectivos en el cadáver de los dípteros con las dosis de 100:1, 500:1, 750:1 y 1.500:1 en *A. aegypti* y únicamente con la dosis de 1.500:1 en *C. quinquefasciatus* (figura 4a).

En ambas especies de mosquitos se registraron casos de reacción inmunitaria evidenciada por la presencia de individuos 'melanizados' (figura 4b), pero en todos los casos, incluso cuando el nematodo resultó 'melanizado', el huésped murió.

En *C. quinquefasciatus*, el 84 % de las larvas parasitadas presentó especímenes juveniles infectivos 'melanizados' en su interior y los mayores porcentajes se registraron con las dosis de 500:1 y 750:1 (cuadro 2). Se hallaron diferencias significativas entre las dosis (*F*=74,56; gl=7; p<0,0001). En *A. aegypti,* el 28 % de las larvas parasitadas mostraron especímenes juveniles infectivos 'melanizados', y los mayores porcentajes correspondieron a las dosis de 750:1 y 1.500:1 (cuadro 2). Hubo diferencias significativas entre las dosis (*F*=87,43; gl=7; p<0,0001).

En las dos especies de mosquitos, además de los especímenes juveniles infectivos 'melanizados', se observaron nematodos adultos. Los porcentajes de larvas de mosquitos en esta situación fueron de 14 y 55 % en *C. quinquefasciatus* y en *A. aegypti*, respectivamente. Se presentaron diferencias significativas en el número total de nematodos (nematodos adultos + especímenes

Cuadro 1. Porcentaje promedio de parasitismo (± error estándar) por *Heterorhabditis bacteriophora* en los distintos estadios larvales de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*

	Estadios larvales		
	II	III	IV
Culex quinquefasciatus	5,83 ± 1,40[a]	23,85 ± 3,85[b]	7,92 ± 1,79[a]
Aedes aegypti	4,69 ± 0,99[a]	27,40 ± 5,77[b]	6,98 ± 1,72[a]

Las letras en superíndice indican diferencias significativas (p<0,05).

Cuadro 2. Número promedio (± error estándar) de nematodos adultos*, especímenes juveniles infectivos 'melanizados' y número total de nematodos en el interior de larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* con las distintas dosis

		Dosis de nematodos							
		0:0	**1:1**	**5:1**	**15:1**	**100:1**	**500:1**	**750:1**	**1.500:1**
Culex quinquefasciatus	Nematodos adultos*	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0,1±0,1^{a}	0,4±0,1^{b}	0,7±0,1^{c}	0,6±0,1^{bc}	0,8±0,04^{c}
	Especímenes juveniles infectivos 'melanizados'	0±0^{a}	1,2±0,7^{ab}	5±1,7^{ab}	14,7±4,5^{b}	52,2±3,4^{c}	96±8,8^{e}	88,2±3,1^{de}	81,7±8,04^{d}
	Total de nematodos en el insecto	0±0^{a}	1,2±0,7^{a}	5±1,7^{a}	15,5±4,9^{a}	54,5±3,5^{b}	101,7±9,9^{c}	92±3,7^{c}	87,2±8,5^{c}
Aedes aegypti	Nematodos adultos*	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0,08±0,1^{a}	1,1±0,1^{b}	1,7±0,06^{c}	1,7±0,1^{c}	1,6±0,06^{c}
	Especímenes juveniles infectivos 'melanizados'	0±0^{a}	1,7±0,2^{a}	0±0^{a}	1,7±1^{a}	8,7±0,4^{ab}	37,7±2,6^{c}	43,7±4,7^{cd}	46,7±3,2^{d}
	Total de nematodos en el insecto	0±0^{a}	1,7±0,2^{a}	0±0^{a}	2±0,9^{a}	22,2±5^{a}	97±10,3^{b}	97±17,8^{b}	94,2±7,3^{b}

Las letras en superíndice indican diferencias significativas (p<0,05).
* $\log_{10}$ (número de nematodos adultos +1)

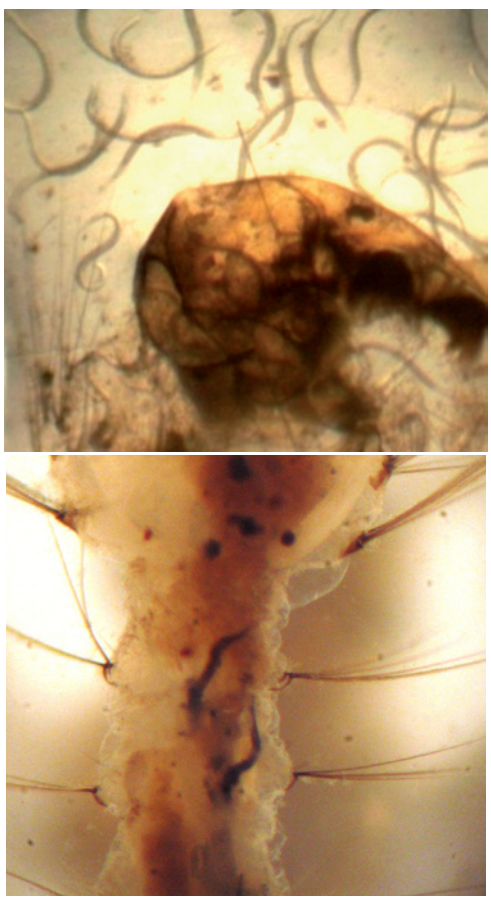


Figura 4. a. Especímenes juveniles infectivos al final del ciclo parasitario en una larva de mosquito. **b.** Especímenes juveniles infectivos 'melanizados' en el tórax de una larva de mosquito.

juveniles infectivos 'melanizados') que ingresaron en el insecto según la dosis en *C. quinquefasciatus* (*F*=69,34; gl=7; p<0,0001) y en *A. aegypti* (*F*=35,95; gl=7; p<0,0001) (cuadro 2). A partir de la dosis de 500:1, se obtuvieron las mayores cantidades de nematodos en ambas especies.

El mayor porcentaje de especímenes juveniles infectivos 'melanizados' se registró en el tórax de las larvas de *C. quinquefasciatus*, lo cual difirió significativamente del resto de las regiones corporales (*F*=20,37; gl=3; p<0,0001) (figura 5), en tanto que en *A. aegypti*, los mayores porcentajes se encontraron en el tórax y el abdomen, observándose diferencias significativas entre estas regiones corporales y las demás (*F*=11,53; gl=3; p<0,0001) (figura 5).

Discusión

Los resultados de este trabajo evidenciaron que *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* son sensibles a diferentes dosis de *H. bacteriophora* N4 en condiciones de laboratorio. La muerte de las larvas ocurrió a partir de las 24 horas del contacto con los nematodos con las tres dosis más altas. La mortalidad larval superó el 70 % en ambos huéspedes y se incrementó con el aumento de la dosis. En *A. aegypti*, los mayores porcentajes de parasitismo se alcanzaron en menor tiempo.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos con *C. quinquefasciatus* fueron inferiores a los de otro estudio en Egipto con *H. bacteriophora* (96 %), aunque en aquel se utilizó una dosis menor (300 especímenes juveniles infectivos por larva) a las del presente trabajo (30). En un estudio en Estados Unidos, se obtuvo 100 % de parasitismo en larvas de *C. pipiens* (21) empleando una dosis muy superior (6.000 especímenes juveniles infectivos por larva) de *H. bacteriophora*.

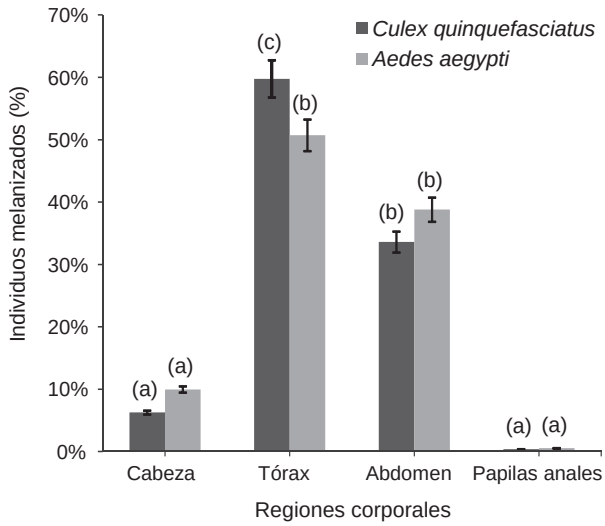


Figura 5. Porcentajes de especímenes juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* 'melanizados' en las distintas regiones corporales *de Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*. Las letras en las barras indican diferencias significativas (p≤0,05).

En ensayos realizados en Argentina, no se registró parasitismo en *C. pipiens* ni *C. saltanensis* con dos aislamientos autóctonos de *H. bacteriophora*, uno de Río Negro y otro de Río Cuarto, con dosis de 500 y 1.000 especímenes juveniles infectivos por larva, respectivamente (22,23). En otros experimentos con *C. quinquefasciatus* y *Steinernema rarum* (OLI) en Córdoba, se observó también un incremento en la mortalidad larval al aumentar la dosis, con un porcentaje mayor (89 %) con las dosis más altas empleadas en este trabajo (Cagnolo S, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* al parasitismo por *Steinernema rarum* (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. V Jornadas Regionales sobre Mosquitos. La Plata; 2007) y un porcentaje similar (75 %) en *C. apicinus* con una dosis menor (400 especímenes juveniles infectivos por larva) (24).

En contraste con los resultados de este trabajo, los valores de mortalidad de *C. quinquefasciatus* no superaron el 7 % con *S. carpocapsae* y *S. feltiae* provenientes de El Cairo en dosis entre 50 y 300 especímenes juveniles infectivos por larva (30). Los resultados en *A. aegypti* evidenciaron la misma tendencia que los obtenidos con otros aislamientos de *H. bacteriophora* N116 y *S. rarum* (OLI) de Córdoba, en los cuales la mortalidad se incrementó con el aumento de la dosis (Cagnolo SR, Rivero ME, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae), en condiciones de laboratorio. Nematropica. 2007;37:142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina) (20).

Las variaciones en los porcentajes de mortalidad obtenidos con los distintos aislamientos reflejarían diferencias intraespecíficas. Como se sabe, si bien los nematodos entomopatógenos poseen un amplio rango de huéspedes, distintos aislamientos pertenecientes a una misma especie pueden diferenciarse entre sí en cuanto a su capacidad infecciosa, lo cual probablemente estaría relacionado con su comportamiento (25), con la sensibilidad del insecto y con factores ambientales (26).

En este trabajo se obtuvo una DL_{50} más baja para *A. aegypti* que la obtenida para *C. quinquefasciatus*, lo cual indicaría una mayor virulencia de este aislamiento en *A. aegypti.* Se han obtenido valores de DL_{50} similares a los de este trabajo para *C. quinquefasciatus* con los aislamientos de *H. bacteriophora* (121,5 especímenes juveniles infectivos por larva) y *H. indica* (141,7 especímenes juveniles infectivos por larva) (30). Por el contrario, se obtuvieron valores inferiores de DL_{50} con *H. bacteriophora* (80 especímenes juveniles infectivos por larva) y en larvas de tercer y cuarto estadio con *C. pipiens* (63 especímenes juveniles infectivos por larva) (21). Por otro lado, la DL_{50} obtenida en este trabajo para *A. aegypti* difiere con lo registrado con *H. heliothidis* (141 especímenes juveniles infectivos por larva) y con *S. feltiae* (1,26 especímenes juveniles infectivos por larva) en este mismo díptero (19).

La mortalidad de las larvas de mosquitos, independientemente de la dosis, resultó mayor en el tercer estadio de desarrollo en las dos especies de huéspedes. En otros estudios se han obtenido resultados similares (19,20,21,24,30). Por el contrario, en un experimento con *S. rarum* (OLI), los mayores porcentajes de mortalidad en *A. aegypti* correspondieron a las larvas de segundo estadio (Cagnolo SR, Rivero ME, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae), en condiciones de laboratorio. Nematropica. 2007;37: 142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Las diferencias en la mortalidad según el estadio podrían atribuirse al hecho de que los nematodos son desechados como alimento en los estadios larvales tempranos

del mosquito debido a su tamaño; en el caso de las larvas de segundo estadio, se ha sugerido que la pequeña abertura oral que poseen no les permitiría ingerir los nematodos enteros, sino que los triturarían con sus dientes mandibulares, causándoles la muerte (21). Los estadios larvales mayores podrían, por el contrario, ingerir los nematodos sin dañarlos, lo que resultaría en una mayor sensibilidad a la infección (21,31).

El engrosamiento de la pared cuticular en los estadios larvales más jóvenes de los mosquitos es reducido. Los especímenes juveniles infectivos de *Heterorhabditis* poseen una estructura cefálica que les permite perforar dicha pared, por lo que la penetración a través de la cutícula de los insectos representa una vía adicional de ingreso por las aberturas naturales (32). En este sentido, se ha señalado que los nematodos podrían ingresar en las larvas de segundo estadio por esta vía y provocar la muerte en los estadios posteriores mediante la proliferación de la bacteria simbionte (20).

En la presente investigación se evidenció que los estadios infectivos de *H. bacteriophora* N4 son capaces de ingresar a la cavidad del cuerpo de las larvas de ambas especies huéspedes y desarrollarse exitosamente, produciendo una nueva generación de especímenes juveniles infectivos. El número de nematodos adultos registrados fue mayor en *A. aegypti* con todas las dosis. Asimismo, la generación de nuevos especímenes juveniles infectivos al finalizar el ciclo parasitario, se observó a partir de la dosis de 100:1 en *A. aegypti* y solo en la dosis más alta en *C. quinquefasciatus*, lo cual coincide con lo registrado en otros trabajos (Cagnolo S, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* al parasitismo por *Steinernema rarum* (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio.V Jornadas Regionales sobre Mosquitos. La Plata; 2007) (20,24).

El mecanismo de melanización fue mucho más fuerte en *C. quinquefasciatus*, pues la mayoría de los nematodos que ingresaron a las larvas se 'melanizaron' con todas las dosis. En ambas especies la reacción defensiva se incrementó a medida que aumentó el número de nematodos que ingresaron en el cuerpo de los dípteros. Esto coincide con lo observado en *A. aegypti* con *H. bacteriophora* N116 (20) y con *S. rarum* (Cagnolo SR, Rivero M, Almirón WR. Respuesta inmunitaria de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por nematodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae). 5º Jornadas Regionales sobre Mosquitos. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata. 4-5 de octubre de 2007. La Plata, Buenos Aires.). En *C. quinquefasciatus* se observaron resultados similares con *S. carpocapsae* y *S. feltiae*, pues la mayoría de los nematodos no pudieron desarrollarse en las larvas del mosquito y fueron 'melanizados' (30). Por el contrario, en ensayos realizados en *A. aegypti* con los nematodos *H. heliothidis* y *S. feltiae*, se observó que la reacción de melanización disminuyó al aumentar la cantidad de nematodos en el interior de las larvas (19). En *C. quinquefasciatus* el mayor porcentaje de especímenes juveniles infectivos 'melanizados' se observó en el tórax de las larvas, y en *A. aegypti* en el tórax y el abdomen, en concordancia con lo registrado con el aislamiento de *Heterorhabditis* N116 (20). Con *S. rarum* (OLI), los especímenes juveniles infectivos 'melanizados' se observaron principalmente en el abdomen de las larvas de *A. aegypti* (Peschiutta ML, Cagnolo S, Almirón WR. Respuesta inmune de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo de *Heterorhabditis* sp. (Nematodo: Heterorhabditidae. V Congreso Argentino de Parasitología. La Plata; 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que *H. bacteriophora* N4 es capaz de matar a las larvas de las dos especies de mosquitos, aunque *A. aegypti* parecería ser más sensible que *C. quinquefasciatus*.

Los aislamientos de nematodos se consideran biotipos o razas que, en ocasiones, exhiben características biológicas significativamente diferentes (33), por lo cual se ha sugerido que con agentes autóctonos se lograría un mayor control biológico, dado que están ecológicamente adaptados al ambiente y a las plagas existentes en los ecosistemas donde se aplican (34).

La información obtenida en el presente estudio es importante porque demuestra la gran potencialidad de *H. bacteriophora* N4 como regulador biológico de larvas de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* y, además, porque los ensayos se hicieron con un aislamiento autóctono, por lo cual sería interesante continuar la evaluación de dicho aislamiento en condiciones de campo, con el fin de determinar su capacidad infecciosa y su persistencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Referencias

1. **Almirón WR, Crocco L.** Mosquitos urbanos transmisores de dengue y encefalitis de San Luis. Manual de capacitación docente. Córdoba, Argentina: Ed. Universitas; 2007. p. 48.
2. **Santamarina-Mijares A, Pérez-Pacheco R, Martínez SH.** Susceptibilidad de las larvas de *Aedes aegypti* al parasitismo por *Romanomermis culicivorax* en condiciones de laboratorio y de campo en Oaxaca, México. Rev Panam Salud Pública. 2000;8:299-304. https://doi.org/10.1590/S1020-49892000001000001.
3. **Grech, M, Visintín A, Laurito M, Estallo E, Lorenzo P, Roccia I, *et al*.** New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Neuquén and La Rioja provinces, Argentina. Rev Saúde Pública. 2012;46:387-9. https://doi.org/10.1590/S0034-89102012005000007
4. **Sabattini M.** Importancia actual de los arbovirus en Argentina. Sitio Argentino de Producción Animal. 2010;266:1-4.
5. **Ministerio de Salud de la Nación.** Fiebre chikunguña - Circulación viral en Bolivia y Paraguay. Fortalecimiento de la vigilancia y acciones de prevención en localidades fronterizas. Fecha de consulta: 11 de julio de 2016. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2015/10-02-2015-alerta-1chikun.pdf.
6. **Ministerio de Salud de la Nación.** Comunicación. OPS/OMS alerta por situación de fiebre amarilla. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2016/05-05-2016-comunicacion-por-fiebre-amarilla.pdf.
7. **Ministerio de Salud de la Nación.** Comunicación. Transmisión local de virus Zika en la Argentina. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2016/26-02-2016-comunicacion-transmision-local-zika.pdf.
8. **Organización Mundial de la Salud.** Dengue y dengue grave. Nota descriptiva. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/.
9. **La Nación.** Dengue: alertan que hay un 70 % más de casos que en 2009. Fecha de consulta: 13 de julio de 2016. Disponible en: http://www.lanacion.com.ar/1892515.
10. **Sabattini MS, Avilés G, Monath TP.** Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. En: Travassos da Rosa AP, Vasconcelos PF, Travassos da Rosa JF, editores. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belem, Parà, Brasil: Instituto Evandro Chagas; 1998. p. 113-34.
11. **Spinsanti L, Basquiera A, Bulacio S, Kim S, Somale V, Ré V, *et al*.** St. Louis encephalitis in Argentina: The first case reported in the last seventeen years. Emerg Infect Dis. 2003;9:271-3. https://doi.org/10.3201/eid0902.020301
12. **Díaz LA, Almirón WR, Ludueña-Almeida F, Spinsanti LI, Contigiani MS.** Vigilancia del virus encefalitis de San Luis y mosquitos (Diptera: Culicidae) en la provincia de Córdoba, Argentina. Entomología y Vectores. 2003;10:551-66.
13. **Ministerio de Salud de la Nación.** Brote de encefalitis de San Luis en Pergamino. Fecha de consulta: 11 de julio de 2016. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2015/24-04-2015-alerta-casos-encefalitis-san-luis.pdf.
14. **Enría DA, Morales MA.** Temas de Zoonosis IV. Virus del Oeste del Nilo: su emergencia en las Américas. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: http://repositorio.anlis.gov.ar/xmlui/bitstream/handle/ 123456 789/529/RevistaVeterinariaArgentina,2010,XXX,303..pdf?sequence=1.
15. **Solís-Rojas C.** Alternativas diversas para el combate y optimización de estrategias en el manejo de mosquitos culícidos en la zona metropolitana de Monterrey N. L. México (tesis). San Nicolás de Los Garza, Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2000.
16. **Adams BJ, Nguyen KB.** Taxonomy and systematic. En: Gaugler R, editor. Entomopathogenic Nematology. Wallingford, UK: CAB International; 2002. p. 1-33.
17. **Lewis EE, Campbell J, Griyn CH, Kaya H, Peters A.** Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. Biological Control. 2006;38:66-79. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007
18. **Gaugler R, Kaya HK.** Entomopathogenic nematodes in biological control. Boston: CRC Press; 1990. p. 365.
19. **Molta NB, Hominick WM.** Dose- and time-response assessments of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) against *Aedes aegypti* larvae. Entomophaga.1989;34:485-93. https://doi.org/10.1007/BF02374386
20. **Peschiutta ML, Cagnolo SR, Almirón WR.** Susceptibility of larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae). Rev Soc Entomol Argent. 2014;73:99-108.
21. **Poinar GO Jr, Kaul HN.** Parasitism of the mosquito *Culex pipiens* by the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. J Invertebr Pathol.1982;39:382-7. https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90063-5
22. **de Doucet MM, Giayetto AL.** Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematología mediterránea. 1994;22:171-7.
23. **de Doucet MM, Bertolotti MA, Giayetto AL, Miranda MB.** Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. J Invertebr Pathol.1999;73:237-42. https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4831
24. **Cagnolo SR, Almirón WR.** Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). Rev Soc Entomol Argent. 2010;69:141-5.
25. **Fairbairn JP, Fenton A, Norman RA, Hudson PJ.** The invasion efficiency of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditidae: Steinernematidae). Asp Appl Biol. 1999;53:83-8.
26. **El Sadawy HA, Saleh MM.** Infectivity of Egyptian and imported entomopathogenic nematodes under different temperatures. International Journal of Nematology. 1999;9:72-5.
27. **Kaya HK, Stock SP.** Techniques in insect nematology. En: Lacey L, editor. Manual of techniques in insect pathology. Londres, UK: Academic Press; 1997. p. 281-324.

28. **Domínguez, CM, Ludueña-Almeida F, Almirón WR.** Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba Capital. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 2000;59:41-50.

29. **Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW.** InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; 2013.

30. **Zohdy NM, Shamseldean MM, Abd-El-Samie EM, Hamama HM.** Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid nematodes for controlling the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Journal of Mosquito Research. 2013;3:33-44. https://doi.org/10.5376/jmr.2013.03.0005

31. **Dadd RH.** Size limitations on the infectivity of mosquito larvae by nematodes during filter-feeding. J InvertebrPathol. 1971; 18:246-51. https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90152-2

32. **Bedding RA, Molyneux AS.** Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematologica. 1982;28:354-9.

33. **Baker GL, Capinera JH.** Nematodes and nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. Memories of the Entomological Society of Canada. 1997;171:157-211. https://doi.org/10.4039/entm129171157-1

34. **Poinar GO Jr.** Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En: Gaugler R, Kaya HK, editors. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 23-61.

Biomédica 2017;37(Supl.2):77-82
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3444

ARTÍCULO ORIGINAL

Parámetros biológicos de *Meccus phyllosomus phyllosomus* (Burmeister) 1835, de *Triatoma recurva* (Stål) 1868 (Hemiptera, Reduviidae) y de sus híbridos de laboratorio

Lizbeth Díaz[1], Karen Covarrubias[1], Ángel Licón[2], Mixtli Astorga[1], Yaneth Moreno[1], José Alejandro Martínez[3]

[1] Carrera de Medicina, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Ciudad Guzmán, Jalisco, México
[2] Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, México
[3] Laboratorio de Entomología Médica, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Ciudad Guzmán, Jalisco, México

Introducción. Los híbridos de especies y subespecies de triatominos mexicanos exhiben características biológicas y de comportamiento sobresalientes comparadas con las de sus parentales, específicamente su vigor híbrido, lo cual puede incrementar el riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* a sus huéspedes humanos y animales.
Objetivo. Describir y comparar los valores de los parámetros biológicos relacionados con el ciclo de vida de *Triatoma recurva*, de *Meccus phyllosomus phyllosomus* y de sus híbridos de laboratorio, para estimar su riesgo como transmisores de *T. cruzi* a las poblaciones humanas.
Materiales y métodos. Se entrecruzaron ejemplares de *T. recurva* y de *M. p. phyllosomus* y se obtuvo una cohorte híbrida. Las tres cohortes se mantuvieron bajo condiciones similares de laboratorio. En las tres se compararon los datos de sus ciclos de vida, el número de alimentaciones necesarias para mudar, el porcentaje de mortalidad, el de eclosión de huevos y la fecundidad de las hembras.
Resultados. La cohorte híbrida tuvo el menor tiempo promedio entre el primer *instar* o estadio y el adulto (136,6 ± 17,5 días). El número de alimentaciones para cambiar de *instar* (13,4 ± 1,7; 15,6 ± 5,2) fue mayor en la cohorte híbrida y en la de *T. recurva*. La cohorte híbrida registró la menor mortalidad (29 %) y el mayor porcentaje (70 %) de hembras al final del ciclo biológico. La fecundidad por hembra por día (rango: 1,1 ± 0,6 -1,6 ± 0,7) fue similar entre las poblaciones. El porcentaje de eclosión de huevos fue superior a 70 % en la cohorte híbrida y en la de *M. p. phyllosomus*.
Conclusión. La cohorte híbrida presentó algunas características biológicas que implicarían un mayor poder transmisor de *T. cruzi* que el de sus grupos parentales.

Palabras clave: Triatominae; *Trypanosoma cruzi*; enfermedad de Chagas; estadios del ciclo de vida; México

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3444

Biological parameters of *Meccus phyllosomus phyllosomus* (Burmeister), 1835, *Triatoma recurva* (Stål), 1868 (Hemiptera, Reduviidae) and their laboratory hybrids

Introduction: Hybrids from species and subspecies of Mexican triatomines have shown outstanding biological and behavioral characteristics as compared with their parental groups. This could lead to an increasing risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* to human and animal reservoir hosts.
Objective: To describe and compare biological parameters related to the life cycle of *Triatoma recurva*, *Meccus phyllosomus phyllosomus* and their laboratory hybrids and estimate their risk as transmitters of *T. cruzi* to humans.
Materials and methods: We kept a cohort of each one of the three groups (*T. recurva*, *M. p. phyllosomus* and their hybrids) under similar laboratory conditions and then compared them to record the data related to their life cycles, number of blood meals to molt, mortality rates, egg eclosion rates and female fecundity.
Results: The hybrid cohort showed the lowest mean time from first-instar nymph to adult (136.6 ± 17.5 days). The number of blood meals from molt to next instar (13.4 ± 1.7; 15.6 ± 5.2) was higher in the hybrid and *T. recurva* cohorts. The hybrid cohort showed the lowest mortality rate (29.5%) and the

Contribución de los autores:
José Alejandro Martínez-Ibarra: supervisión del equipo de trabajo, diseño del estudio y análisis de resultados
Ángel Licón y Mixtli Astorga: diseño del estudio y análisis de resultados
Todos los autores participaron en las recolecciones en campo, el trabajo de laboratorio y la escritura del manuscrito.

highest rate (70%) of adult females at the end of the biological cycle. Fecundity per day per female (range: 1.1 ± 0.6– 1.6 ± 0.7 eggs) was similar in the three cohorts. Egg hatching rate was higher than 70% in both hybrid and *M. p. phyllosomus* cohorts.
Conclusion: The hybrid cohort showed some outstanding biological characteristics, which would entail a higher risk of transmission of *T. cruzi* to hosts than their parentals.

Key words: Triatominae; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; life cycle stages; Mexico.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3444

En México existen, al menos, 32 especies de triatominos. De estas, nueve se consideran las de mayor importancia epidemiológica (1), incluidas cinco de las seis que integran el revalidado género *Meccus* (2-4), pues se estima que son responsables de 74 % de la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* a los seres humanos en México (5).

Dado que existe una controversia sobre el nivel taxonómico (especies o subspecies) de los seis grupos de *Meccus*, se sugiere consultar una publicación reciente (6) en la cual se esclarece un tanto el tema. En este contexto, en el presente trabajo uno de los grupos estudiados fue *Meccus phyllosomus phyllosomus,* grupo que se encuentra distribuido en el sur de México, donde se le considera de importancia epidemiológica.

Asimismo, entre las nueve especies mexicanas de más importancia está *Triatoma recurva*, considerada un vector importante en las zonas norte y noroeste de México (1). Dado que algunos análisis moleculares (7,8) han establecido que *T. recurva* es filogenéticamente cercana a las subspecies de *Meccus*, en un estudio se entrecruzaron (incluidos cruces inversos) estas seis subspecies con *T. recurva*, con un único cruce exitoso: el de ♀ *T. recurva* y ♂ *M. p. phyllosomus* (9).

En dos estudios recientes (10,11) sobre los parámetros biológicos de los híbridos de grupos filogenéticamente cercanos, se ha demostrado el vigor híbrido de los descendientes, con el consecuente aumento del riesgo de transmisión de *T. cruzi* a las poblaciones humanas. Por ello, el objetivo de este estudio fue conocer los parámetros biológicos de los parentales de *T. recurva*, *M. p. phyllosomus* y de sus descendientes.

Correspondencia:
José Alejandro Martínez-Ibarra, Laboratorio de Entomología Médica, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Avenida Enrique Arreola Silva 884, 49000 Ciudad Guzmán, Jalisco, México
Teléfono y fax: (52) (341) 575 2222
aibarra@cusur.udg.mx

Recibido: 23/08/16; aceptado: 23/06/17

Materiales y métodos

Material biológico

Para este estudio se utilizaron dos colonias de triatominos establecidas desde 2014; se recolectó un mínimo de 30 individuos procedentes de refugios de animales domésticos y de granja en el peridomicilio en dos localidades ubicadas en diferentes regiones de México. *Triatoma recurva* se recolectó en Satevó, Chihuahua (26° 58’ N, 107° 42 ’O), en tanto que los individuos de *M. p. phyllosomus* procedían de Tehuantepec, Oaxaca (16° 28’ N, 95° 19’ O).

Los ejemplares recolectados en las áreas descritas se identificaron mediante las claves taxonómicas de uso más común (12), teniendo en cuenta la revalidación del género *Meccus* (2).

Entrecruzamientos

Se hicieron cuatro sets de cruces. En el set A se entrecruzaron individualmente 10 hembras de *T. recurva* con 10 machos de *M. p. phyllosomus*. En el set B se hizo el cruce inverso: 10 machos de *T. recurva* con 10 hembras de *M. p. phyllosomus*, aunque en un estudio anterior se detectó su inviabilidad. Los sets C y D incluyeron los cruces parentales de 10 hembras y 10 machos de *T. recurva* y de 10 hembras y 10 machos de *M. p. phyllosomus*, respectivamente.

Parámetros biológicos

Las parejas entrecruzadas se mantuvieron bajo una temperatura de 25 ± 1 ºC, una humedad relativa de 70 ± 5 % y un fotoperiodo de 12 horas. A todos los ejemplares se les alimentó quincenalmente sobre conejos Nueva Zelanda inmovilizados, previamente anestesiados con 0,25 ml/kg de ketamina, en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana (13) y los lineamientos del Comité de Ética del Centro Universitario del Sur de la Universidad de Guadalajara.

Se seleccionaron conejos como fuente de alimentación dado que en estudios previos (14,15) con *T. recurva y M. p. phyllosomus*, se ha concluido que son una buena fuente de alimentación sanguínea, ya que favorecen ciclos cortos en los triatominos, así como otros parámetros biológicos.

Se recolectaron los huevos de cada colonia hasta obtener 200 de cada una. Después de la eclosión, se conformaron grupos de 10 ninfas de cada población, nueve de las cuales pudieron marcarse distintiva e individualmente en el pronoto y el conexivo con marcador rojo indeleble como sigue: cuadrante superior izquierdo, cuadrante superior derecho, cuadrante inferior izquierdo, cuadrante inferior derecho, cuadrantes superiores, cuadrantes inferiores, cuadrantes laterales izquierdos, cuadrantes laterales derechos o todo el insecto. La ninfa restante se pintó totalmente con marcador azul indeleble. Las ninfas marcadas se colocaron dentro de vasos de plástico de 5,5 cm de diámetro x 10,5 cm de alto, a los cuales se les colocó un papel doblado en forma de acordeón para soporte.

Se observó a las ninfas al final de la alimentación con el fin de registrar individualmente si había ocurrido la ingestión de sangre. Los insectos se llevaron a una incubadora a 25 ± 1 °C de temperatura y 70 ± 5 % de humedad con un fotoperiodo de 12 horas; diariamente se revisó a cada individuo, con el fin de registrar las mudas y las muertes. Al finalizar el ciclo biológico, se registró la proporción de hembras y machos de cada cohorte.

Entre los ejemplares que completaron el desarrollo hasta su fase adulta, se escogieron diez parejas de cada cohorte y cada par se colocó en un recipiente plástico similar al usado con las ninfas y se las crio bajo las condiciones previamente descritas para registrar los datos de oviposición. Los huevos se contaron a lo largo de 90 días y se colocaron en recipientes separados por día de oviposición y por cohorte hasta su eclosión.

Ciclo de vida. Para calcular la duración promedio del ciclo biológico, se estableció la media de duración en días para cada estadio de desarrollo de la siguiente manera: suma del total de días de duración en el estadio de ninfa de cada uno de los individuos (incluidos los de menor y de mayor duración) dividida por el número de individuos en el estadio. El número de alimentaciones hasta la muda se obtuvo dividiendo el número total de alimentaciones que cada individuo requirió para llegar a adulto por el número de ejemplares estudiados por cohorte.

Análisis estadístico

En la comparación de la cantidad de huevos por hembra, el ciclo de vida y el número de alimentaciones, primero se hizo un análisis multivariado mediante el método de Holm-Sidak, y se encontró que las distribuciones eran normales, por lo que se procedió a hacer el análisis de varianza (ANOVA).

En la comparación de los porcentajes de mortalidad entre los grupos de estudio, se utilizó la prueba de ji al cuadrado. Las diferencias se consideraron significativas cuando p resultó menor de 0,05. Los análisis se hicieron con el paquete estadístico Sigma Stat, versión 3.1 para Windows (Systat Software Inc., San José, California, Estados Unidos).

Resultados

Del set de cruces B (10 machos de *T. recurva* con 10 hembras de *M. p. phyllosomus*) no se obtuvo ni un solo huevo fértil, por lo cual no fue posible obtener información sobre sus parámetros biológicos. De los cruces de los tres sets restantes, sí se obtuvo descendencia.

El ciclo de vida de las tres cohortes en estudio fue significativamente diferente (t=6,06, t=5,55, gl=2, p<0,05); la cohorte híbrida y la parental de *T. recurva* tuvieron el menor tiempo y el más largo, respectivamente (cuadro 1). El número medio de alimentaciones requerido para mudar del primer *instar* o estadio a adulto varió entre 8 y 21 veces, siendo significativamente menor únicamente en la cohorte de *M. p. phyllosomus* (t=7,45, t=5,99, gl=2, p<0,05) (cuadro 1).

El porcentaje de mortalidad varió de casi la tercera parte de los ejemplares híbridos a un poco más de 80 % en *T. recurva*, registrándose diferencias significativas (χ^2=13,57, χ^2=15,98, χ^2=17,59, gl=1, p<0,05) entre las tres cohortes estudiadas (cuadro 1).

El porcentaje de hembras fue significativamente mayor (χ^2=15,24, χ^2=16,31, gl=1, p<0,05) en la cohorte híbrida que en las dos parentales, en las cuales no difirió (χ^2=0,04 gl=1, p<0,05). Un fenómeno similar ocurrió con los machos (χ^2=14,15, χ^2=12,95, gl=1, p<0,05) (cuadro 2).

El porcentaje de eclosión de huevos varió significativamente (χ^2=9,46, χ^2=1,gl=1,p<0,05) entre las cohortes de *T. recurva* y las de *M. p. phyllosomus*, en las cuales no se registró una diferencia significativa con respecto a la cohorte híbrida (cuadro 2).

La fecundidad por hembra por día, por el contrario, fue similar (t=1,81, t=1,59, gl=1, p>0,05) en las tres cohortes estudiadas (cuadro 2).

Discusión

La duración del ciclo de vida en las dos cohortes parentales fue similar a lo reportado previamente para dichos grupos (14,15). Sin embargo, el ciclo de vida de los híbridos fue de menor duración que el de ambos parentales, incluido el ciclo más corto de *M. p. phyllosomus*. Un fenómeno similar se reportó

Cuadro 1. Ciclo de desarrollo de huevo a adulto de *Triatoma recurva*, *Meccus phyllosomus phyllosomus* y sus híbridos, expresado en días, porcentaje de mortalidad acumulada de ninfas y número de alimentaciones necesario para mudar, expresado en días (media y desviación estándar) (media ± DE)

	Meccus phyllosomus phyllosomus				*Triatoma recurva*				Híbrido			
	Ninfas (n)	Ciclo de vida	Mortalidad (%)	Alimentaciones	Ninfas (n)	Ciclo de vida	Mortalidad (%)	Alimentaciones	Ninfas (n)	Ciclo de vida	Mortalidad (%)	Alimentaciones
Huevo-NI	118	19,4 ± 1,6	-	-	132	20,4 ± 2,6	-	-	93	19,6 ± 1,1	-	-
NI-NII	92	20,7 ± 6,6	22,0	1,2 ± 1,0	77	16,7 ± 3,7	41,7	2,2 ± 1,7	83	10,6 ± 5,6	10,8	1,2 ± 1,4
NII-NIII	82	23,1 ± 4,6	8,5	1,4 ± 1,2	66	33,1 ± 14,4	8,3	4,2 ± 2,1	78	13,7 ± 5,2	5,4	3,1 ± 1,9
NIII-NIV	78	36,6 ± 18,4	3,4	1,5 ± 1,4	57	41,6 ± 16,5	6,8	3,8 ± 2,1	76	28,4 ± 14,4	2,2	3,5 ± 2,2
NIV-NV	73	52,1 ± 14,4	4,2	2,3 ± 1,1	47	69,1 ± 21,3	7,6	4,2 ± 1,9	73	30,1 ± 15,6	3,2	3,9 ± 1,6
NV-AD	61	76,1 ± 8,5	10,2	3,2 ± 1,1	25	96,1 ± 24,1	16,7	3,6 ± 1,9	66	54,4 ± 5,5	7,5	3,3 ± 1,5
Total		172,7 ± 21,4[b]	48,0[b]	8,1 ± 1,4[b]		264,7 ± 29,6[c]	81,1[c]	15,6 ± 5,2[a]		136,6 ± 17,5[a]	29,0[a]	13,4 ± 1,7[a]

Los datos del ciclo de vida y las alimentaciones para mudar se analizaron con ANOVA de una vía y luego con el método de Holm-Sidak. La mortalidad se analizó con la prueba de ji al cuadrado.
Las letras en las columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

Cuadro 2. Porcentaje de cada sexo al final de los ciclos, porcentaje de eclosión de huevos y número medio de huevos por hembra por día en*Triatoma recurva*, *Meccus phyllosomus phyllosomus* y sus híbridos

Población	Hembras		Machos		Eclosión de huevos (%)	Fecundidad por hembra por día
	n	%	n	%		
Híbrido	98	70,00[a]	42	30,00[a]	71,00[a,b]	1,6 ± 0,7[a]
Triatoma recurva	18	54,54[b]	15	45,45[b]	66,5[a]	1,1± 0,6[a]
Meccus p. phyllosomus	50	48,08[b]	54	51,92[b]	79[b]	1,2 ± 0,5[a]

Los datos de fecundidad por hembra por día se analizaron con ANOVA de una vía y luego con el método de Holm-Sidak. Los porcentajes de hembras, de machos y el de la eclosión de huevos se analizaron con la prueba de ji al cuadrado.
Las letras en las columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

en un estudio en el cual se compararon los híbridos de tres subspecies de *M. phyllosomus* (*pallidipennis, mazzottii* y *phyllosomus*) con esta última subspecie (11). La disminución del ciclo biológico de una especie resulta en su rápido incremento, pues cuantos más adultos haya, mayor es la abundancia de la población. Ese rápido incremento de la población de triatominos en un área podría generar, a su vez, un incremento en el riesgo de transmisión de *T. cruzi* a las poblaciones humanas.

Entre 65 y 75 % de los ejemplares de la cohorte de *M. p. phyllosomus* requirió, en promedio, una toma y media de sangre para mudar al siguiente estadio, en tanto que las cohortes de *T. recurva* y la híbrida requirieron de tres tomas. La necesidad de más alimentaciones conlleva, necesariamente, una mayor interacción entre vector y huésped, con el consecuente incremento del riesgo de transmisión de *T. cruzi*, como ocurrió en el caso de la cohorte de *T. recurva* y en la híbrida (16).

Los porcentajes de mortalidad de las cohortes de *T. recurva* y de *M. p. phyllosomus* fueron similares a los de estudios previos (11,14,15), lo cual contribuye a explicar la significativa presencia de *M. p. phyllosomus* en su área de distribución y la poca abundancia de *T. recurva* en gran parte de la suya (17,18). Por su parte, la cohorte híbrida mostró un porcentaje de mortalidad inferior a 30 %, lo cual podría resultar en una gran abundancia de híbridos de los dos grupos bajo estudio, con el consiguiente riesgo de transmisión de *T. cruzi* debido, además, a la capacidad vectorial de dichos híbridos (Memorias de la Semana Nacional de Investigación Científica-CUSur, 2015).

La proporción entre hembras y machos fue de alrededor de 1:1 en las cohortes parentales estudiadas. Aparentemente, dichas cohortes tendrían el mismo potencial de incrementar su abundancia bajo condiciones favorables. Por otra parte, en la cohorte híbrida la proporción de hembras y machos fue de 2:1, lo cual sugeriría que su potencial para aumentar sus poblaciones es mayor, dado que cuanto mayor sea la cantidad de hembras que ponen huevos, mayor será la cantidad de individuos en la población, y ello podría resultar en un incremento del riesgo de transmisión vectorial de *T. cruzi* a los huéspedes en sus áreas de distribución.

El porcentaje de eclosión de los huevos fue mayor en la cohorte de *M. p. phyllosomus* que en las otras dos, sin embargo, solo difirió de manera importante en la cohorte de *T. recurva*. La cohorte híbrida mostró un porcentaje de eclosión significativo y

similar a su parental *M. p. phyllosomus*, así como al de varias especies y subespecies consideradas como importantes vectores de *T. cruzi*, a saber: *T. patagonica*, *T. ryckmani*, *M. p. picturatus* y *M. p. mazzottii* (6,11,19,20).

Si bien la fecundidad por hembra por día no difirió de manera importante entre las tres cohortes bajo estudio, sí fue ligeramente mayor en la cohorte híbrida, confiriéndole una ventaja con respecto a las cohortes parentales. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en la comparación hecha en estudios separados entre *M. p. pallidipennis*, *M. p. longippennis* y *M. p. picturatus* y sus híbridos, y entre *M. p. pallidipennis*, *M. p. mazzottii* y *M. p. phyllosomus,* y sus respectivos híbridos (6,11).

Los resultados más favorables de la cohorte híbrida en la mitad de los parámetros biológicos estudiados indican que esta presenta un fenómeno de heterosis o "vigor híbrido" (21), el cual podría incrementar el riesgo epidemiológico y facilitar la aparición de tripanosomiasis, como se ha registrado en varios países suramericanos con diversas especies (22,23).

La información obtenida en este y otros estudios anteriores (6,10,11) sobre híbridos mexicanos, resalta la necesidad de estudiar la presencia de híbridos en condiciones de campo y conocer su potencial como transmisores de *T. cruzi*.

Conflicto de intereses

Los autores del presente escrito declaran que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado por la Universidad de Guadalajara, proyecto UDG-CUSUR-SA/CIP/009/2015/. Asimismo, se recibieron fondos de la Secretaría de Educación Pública a través del proyecto 230128 UDG-CA-621: "Epidemiología de la tripanosomiasis americana en la región occidente de México".

Referencias

1. **Ramsey JM, Townsend-Peterson A, Carmona-Castro Ó, Moo-Llanes DA, Nakazawa Y, Butrick M, *et al*.** Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Triatominae) and vector transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:339-52. https://doi.org/10.1590/0074-02760140404
2. **Carcavallo R, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C.** Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Proposal for taxonomic arrangements. Entomol Vect. 2000; 7(Suppl.1):1-99.
3. **Bargues MD, Klisiowicz DR, González-Candelas F, Ramsey JM, Monroy C, Ponce C, *et al.*** Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America and its position within the genus *Triatoma*. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2:e233. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000233
4. **Bargues MD, Zuriaga MÁ, Mas-Coma S.** Nuclear rDNA pseudogenes in Chagas disease vectors; evolutionary implications of a new 5.8S+ITS-2 paralogous sequence marker in triatomines of North, Central and northern South America. Infect Genet Evol. 2014;21:134-56. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.028
5. **Ibarra-Cerdeña CN, Sánchez-Cordero V, Townsend-Peterson A, Ramsey JM.** Ecology of North American Triatominae. Acta Trop. 2009;110:178-86. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.11.012
6. **Martínez-Ibarra JA, Nogueda-Torres B, Cárdenas-De la Cruz MÁ, Villagrán ME, de Diego-Cabrera JA, Bustos-Saldaña R.** Biological parameters of interbreeding subspecies of *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in western México. Bull Entomol Res. 2015; 105:763-70. https://doi.org/10.1017/S0007485315000759
7. **Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-Cardiel C, Markow TA.** Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. Mol Phylogenet Evol. 2006;41:209-21. https://doi.org/0.1016/j.ympev.2006.07.001
8. **Espinoza-Gutiérrez B, Martínez-Ibarra JA, Villalobos G, De la Torre P, Laclette JP, Martínez F.** Genetic variation of North American Triatomines (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) initial divergence between species and populations of Chagas disease vector. Am J Trop Med Hyg. 2013;88:275-84. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0105
9. **Martínez-Ibarra JA, Nogueda-Torres B, Licón-Trillo Á, Alejandre-Aguilar R, Salazar-Schettino PM, Vences-Blanco MO.** Biological aspects of crosses between *Triatoma recurva* and other members of the Phyllosoma complex. J Vect Ecol. 2015;40:117-22. https:/doi.org/10.1111/jvec.12133
10. **Martínez-Ibarra JA, Nogueda-Torres B, García-Lino JC, Arroyo-Reyes D, Salazar-Montaño LF, Hernández-Navarro JÁ, *et al.*** Importance of hybrids of *Meccus phyllosomus mazzottii*, *M. p. pallidipennis* and *M. p. phyllosomus* in transmission of *Trypanosoma cruzi* in México. Jpn J Infect Dis. 2016;69:202-6. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.111
11. **Martínez-Ibarra JA, Nogueda-Torres B, Salazar-Montaño LF, García-Lino JC, Arroyo-Reyes D, Hernández-Navarro JÁ.** Comparison of biological fitness in crosses between subspecies of *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in southern México. Insect Sci. 24:114-21. https://doi.org/10.1111.1744-7917.12246
12. **Lent H, Wygodzinsky P.** Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Am Mus Nat Hist.1979;163:123-520.
13. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.** Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio – 1999. Fecha de consulta: 9 de julio de 2016. Disponible en: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.pdf.

14. **Martínez-Ibarra JA, Alejandre-Aguilar R, Torres-Morales A, Trujillo-García JC, Nogueda-Torres B, Trujillo-Contreras F.** Biology of three species of the *Meccus phyllosomus* complex (Hemiptera: ReduviidaeTriatominae) fed on blood of hens and rabbits. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:787-94. https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700014

15. **Martínez-Ibarra JA, Paredes-González E, Licón-Trillo Á, Montañéz-Valdéz OD, Rocha-Chávez G, Nogueda-Torres B.** The biology of three Mexican-American species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae Triatominae): *Triatoma recurva*, *Triatoma protracta* and *Triatoma rubida*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:659-63. https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000500013

16. **Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Presgrave OA, Cunha V, Galvão C.** Influence of temperature and humidity on the nymphal development of *Rhodnius robustus*. Rev Saúde Pública. 2001;35:400-6. https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000400011

17. **Licón-Trillo A, Balsimelli-De La Peña K, Acosta-Legarda M, Leal-Solís I, Nogueda-Torres B, Martínez-Ibarra JA.** Infección natural por *Trypanosoma cruzi* en triatominos del Centro y Norte de México. Bol Mal Salud Amb. 2010;50: 311-3.

18. **Martínez-Ibarra JA, Montañéz-Valdéz OD, Rocha-Chávez G, Tapia-González JM, Nogueda-Torres B.** Presencia de *Meccus longipennis* y *Triatoma recurva* en el estado de Durango, México. Bol Mal Salud Amb. 2012;52:129-33.

19. **Zeledón R, Cordero M, Marroquín R, Seixas-Lorosa E.** Life cycle of *Triatoma ryckmani* (Hemiptera: Reduviidae) in the laboratory, feeding patterns in nature and experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:99-102. https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000100015

20. **Nattero J, Rodríguez CS, Crocco L.** Effects of blood source on food resource use and reproduction in *Triatoma patagonica* Del Ponte (Hemiptera, Reduviidae). J Vect Ecol. 2013;38:127-33. https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12018.x

21. **Kumar-Baranwal V, Mikkilineni V, Usha Barwale-Zehr U, Tyagi AK, Kapoor S.** Heterosis: Emerging ideas about hybrid vigour. J Exp Bot. 2012;63:6309-14. https://doi.org/10.1093/jxb/ers291

22. **Mas-Coma S, Bargues MD.** Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. Acta Trop. 2009;110:112-36. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.013

23. **Almeida CE, Oliveira HJ, Galvão C.** Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. Acta Trop. 2012;122:71-9. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.12.001

Biomédica 2017;37(Supl.2):83-97
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536

ARTÍCULO ORIGINAL

Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoi majuscula* y *Lutzomyia trapidoi*

Jazzmín Arrivillaga-Henríquez[1,2,3], Sandra Enríquez[1], Vanessa Romero[1,4], Gustavo Echeverría[1], Jorge Pérez-Barrera[1], Ana Poveda[1,5], Juan-Carlos Navarro[6], Alon Warburg[2,7], Washington Benítez[1,8]

[1] Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
[2] Programa Prometeo, Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), Quito, Ecuador
[3] Área de Ambiente, Turismo Histórico Cultural, Facultad de Comunicación Social, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
[4] Facultad de Ciencias Biológicas, Carrera de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
[5] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
[6] Laboratorio de Biodiversidad y Salud Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador
[7] Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Molecular Genetics; Institute of Medical Research Israel-Canada; Kuvin Center for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel
[8] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

Introducción. La provincia de Pichincha, Ecuador, es un área endémica de leishmaniasis cutánea, en donde se han determinado como vectores los flebotomíneos antropofílicos con infección natural por *Leishmania* spp. Sin embargo, no se ha evaluado el papel en la transmisión de las especies zoofílicas.
Objetivo. Evaluar la infección natural por *Leishmania* en dos especies de flebotomíneos zoofílicos, *Lutzomyia reburra* y *Lu. barrettoi majuscula,* y en una antropofílica, *Lu. trapidoi*, así como la endofagia y la sinantropía de estas especies en el noroccidente de Pichincha.
Materiales y métodos. Los flebotomíneos se recolectaron en trampas de luz CDC colocadas en diferentes hábitats y altitudes en sitios que son focos de leishmaniasis cutánea. La infección con *Leishmania* spp. se detectó en el ADN genómico de hembras de las especies de flebotomíneos de interés. Se amplificó el gen espaciador interno de la transcripción del ARN ribosómico, unidad I (*ITS1*), y los genes de las topoisomerasas mitocondrial II (*mtTOPOII*) y nuclear II (*TopoII*). Se determinaron los porcentajes de positividad para *Leishmania* a escala espaciotemporal, la proporción de endofagia y el índice de sinantropía.
Resultados. Se determinó la presencia de infección natural por *Le. amazonensis* en *Lu. reburra* (9,5 %) y *Lu. b. majuscula* (23,8 %); en *Lu. trapidoi* se detectaron *Le. amazonensis*, *Le. brazilienis* y *Le. naiffi-lainsoni.* Los flebotomíneos eran asinantrópicos y con baja endofagia.
Conclusión. Se registró por primera vez la presencia de infección natural en *Lu. reburra* y *Lu. barrettoi majuscula* por *Le. amazonensis*, y se demostró la importancia de los flebotomíneos zoofílicos en el mantenimiento del ciclo de transmisión de *Leishmania* spp. en focos endémicos.

Palabras clave: Psychodidae; *Leishmania*; leishmaniasis cutánea; reacción en cadena de la polimerasa; Ecuador.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536

Contribución de los autores:
Jazzmín Arrivillaga-Henríquez: diseño de la investigación, trabajo de campo, identificación de los flebotomíneos, identificación, análisis e interpretación de la secuencias de Leishmania, análisis e interpretación de variables ecoepidemiológicas, y escritura del manuscrito
Sandra Enríquez: coordinación logística, análisis de la base de datos ecológicos, trabajo de campo y revisión crítica del documento
Vanessa Romero y Gustavo Echeverría: extracción de ADN, estandarización del protocolo de extracción, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del gen ITS1 de Leishmania
Jorge Pérez-Barrera: amplificación de genes de la topoisomerasa
Ana Poveda: diseños de oligonucleótidos, amplificación, secuenciación y caracterización de las secuencias de las topoisomerasas y escritura del manuscrito
Juan Carlos Navarro: análisis filogenéticos y escritura del manuscrito
Alon Warburg: trabajo de campo y secuenciación de los amplicones de ITS1 de Leishmania
Washington Benítez: coordinación del proyecto y escritura del manuscrito

Eco-epidemiological aspects, natural detection and molecular identification of *Leishmania* spp. in *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoi majuscula* and *Lutzomyia trapidoi*

Introduction: The province of Pichincha in Ecuador is an endemic area of cutaneous leishmaniasis, where anthropophilic sand flies with natural infection by *Leishmania*, have been reported as vectors. However, the role in transmission of zoophilic species has not been evaluated.
Objective: To evaluate natural infection by *Leishmania* in two zoophilic phlebotomine sand fly species, *Lutzomyia reburra* and *Lu. barrettoi majuscula*, and one anthropophilic species, *Lu. trapidoi*, as well as the endophagy and synanthropism of these species in the northwest of Pichincha.
Materials and methods: Phlebotomines were collected using CDC light traps in different habitats and altitudes with presence of cutaneous leishmaniasis. Leishmania infection was detected using genomic DNA from females of the collected sand flies. We amplified the internal transcribed spacer gene of ribosomal RNA I (*ITS1*), the mitochondrial topoisomerase II gene (*mtTOPOII*), and the nuclear topoisomerase II gene (*TopoII*). Percentages of positivity for *Leishmania*, at spatio-temporal scale, proportion of endophagy and synanthropism index were calculated.
Results: Natural infection was determined for *Le. amazonensis* in *Lu. reburra* (9.5%) and *Lu. b. majuscula* (23.8%), while in *Lu. trapidoi* we detected *Le. amazonensis*, *Le. brazilienis* and *Le. naiffi-lainsoni*. Phlebotomines were asynanthropic and with low endophagy.
Conclusion: Natural infection with *Le. amazonensis* was recorded for the first time in *Lu. reburra* and *Lu. b. majuscula*, demonstrating the importance of zoophilic phlebotomines in the maintenance of the *Leishmania* transmission cycle in endemic foci.

Key words: Psychodidae; *Leishmania*; leishmaniasis, cutaneous; polymerase chain reaction; Ecuador.
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536

La diversidad de flebotomíneos en Ecuador se ha estudiado en localidades geográficas que son focos activos de transmisión de leishmaniasis cutánea (1-3). La región geográfica de la Sierra, en el noroccidente de la Provincia de Pichincha, es una de las áreas geográficas de mayor riqueza en flora y fauna (4). No obstante, ha sufrido un considerable desarrollo urbanístico en las últimas décadas (5) y muchas de sus zonas se han visto afectadas por el cambio de uso de la tierra, lo cual ha resultado en su caracterización epidemiológica como zonas endémicas de leishmaniasis cutánea (6,7).

Las especies de flebotomíneos dominantes en estas zonas, *Lutzomyia (Nyssomyia) trapidoi* (Fairchild y Hertig), *Lu. (Helcocyrtomyia) hartmanni* (Fairchild y Hertig), *Lu. (Lutzomyia) gomezi (Nitzulescu)*, *Lu. (Pshychodopygus) panamensis* (Shannon) y *Lu. (Helcocyrtomyia) ayacuchensis* (Cáceres y Galati), presentan una gran actividad antropofílica (8-14). Además, se han recolectado en zonas con alteraciones en la ecología del paisaje por la acción de la deforestación debida a la explotación maderera y, recientemente, por el desarrollo agropecuario y turístico y la urbanización de zonas rurales (15).

A pesar de que *Lu. trapidoi* y *Lu. hartmanni* son especies antropofílicas (10,14), ocasionalmente se han recolectado en ecosistemas boscosos, cerca de cuevas de armadillos, al igual que *Lu. (Trichophoromyia) reburra* (Fairchild y Hertig), una especie zoofílica asociada a la región andina. En Colombia, *Lu. reburra* está asociada a focos de leishmaniasis cutánea en bosques fragmentados, pero hasta el momento no se ha reportado su infección natural por *Leishmania* (16), lo cual le resta importancia como vector potencial en los estudios ecoepidemiológicos. Otra de las especies recolectadas en cuevas de animales, y asociadas con *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*, es *Lu. (Aragoi) barrettoi majuscula* (Mangabeira), reportada en México como una especie antropofílica (17). Se ha sugerido que en Ecuador esta especie no tiene un comportamiento antropofílico y se asume que es estrictamente zoofílica. La abundancia de estas dos especies zoofílicas de flebotomíneos varía, y se ha asociado con focos activos y endémicos de leishmaniasis cutánea (6-14).

Los estudios ecológicos en focos de transmisión activa de leishmaniasis cutánea en el noroccidente de Pichincha, evidencian que varias especies relativamente abundantes y catalogadas como zoofílicas son dominantes pero epidemiológicamente secundarias comparadas con *Lu. trapidoi*, vector

Correspondencia:
Jazmín Arrivillaga-Henríquez, Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis, Unidad de Entomología Aplicada, Universidad Central del Ecuador, Gatto Sobral y Jerónimo Leiton, Edificio Hospital del día, 3er piso, Quito, Ecuador
Teléfono: (593-02) 290 4801
jazzmin.arrivillaga@gmail.com y jcarrivillaga@edu.uce.ec

Recibido: 09/08/16; aceptado: 27/06/17

principal en estos focos (10,13). Sin embargo, no se ha evaluado la presencia de infección natural por *Leishmania* spp. en algunas de estas especies zoofílicas.

Según el contexto ecoepidemiológico, la tasa de infección natural en flebotomíneos debe evaluarse en diferentes escalas espaciales, ya que su distribución espacial no es homogénea. Esta aproximación espacio-temporal de la infección natural permite reconocer patrones clave en el riesgo y la vulnerabilidad a la infección por agentes patógenos en una zona geográfica donde el vector incriminado o potencial está presente (18-20), y hacer una valoración rápida de los focos de transmisión y las zonas de riesgo.

En este estudio, la hipótesis que se plantea es que las especies de flebotomíneos zoofílicas, principalmente aquellas que están asociadas a cuevas de pequeños mamíferos silvestres incriminados como reservorios potenciales, son sensibles a la infección por *Leishmania* spp. y tienen un papel clave en la circulación de especies de *Leishmania* en focos de gran endemia de leishmaniasis cutánea.

En la detección molecular de *Leishmania* spp. y su tipificación en flebotomíneos, se han empleado el gen citocromo b (*Cyt* b) y la subunidad pequeña ribosómica de la región del ARN (SSU-rRNA) (21). En el presente trabajo, se utilizó el gen espaciador interno de la transcripción del ARN ribosómico, unidad I (*ITS1*), propuesto recientemente para una detección más sensible de *Leishmania* spp. que otros marcadores (22), en especial, cuando se debe detectar de forma rápida la leishmaniasis cutánea (23) y genotipificar especies neotropicales del parásito (24).

Por otra parte, aunque las topoisomerasas no se han empleado para la detección de infección natural por *Leishmania* spp. con fines de diagnóstico y diferenciación taxonómica, en una revisión reciente se analizó su potencial como blanco molecular para el desarrollo de soluciones terapéuticas. Las topoisomerasas tienen un papel esencial como moduladoras de la topología del ADN mediante el control del grado de 'superenrollamiento' del ADN o la eliminación de nudos generados durante procesos celulares como la replicación, la transcripción o la reparación. Se han establecido dos familias de topoisomerasas, las de tipo I y las de tipo II, cuyo mecanismo de acción difiere, lo cual podría tener un valor agregado de diferenciación taxonómica en *Leishmania* spp. dada su variabilidad genética (25,26).

El objetivo general del presente estudio fue evaluar la infección natural por *Leishmania* spp. en dos especies de flebotomíneos zoofílicos, *Lu. reburra* y *Lu. barrettoi majuscula,* y en una especie antropofílica, *Lu. trapidoi,* a escala espacio-temporal, así como caracterizar y evaluar la congruencia en la identificación de *Leishmania* spp. en flebótomos mediante el empleo de un fragmento del gen de la topoisomerasa II mitocondrial (*mtTOPOII*) y del gen de la topoisomerasa II nuclear (*TOPOII*) paralelamente con la región ITS-1.

Materiales y métodos

Área de estudio

Los ejemplares se recolectaron en cinco localidades: Milpe (MI), Mashpi (MS), Pedro Vicente Maldonado-vía el Progreso (PVM), Puerto Rico-Puerto Quito (PR) y La Isla (I), ubicadas en áreas endémicas de leishmaniasis cutánea en el noroccidente de la provincia de Pichincha (cuadro 1, figura 1). Las localidades se encuentran en dos áreas biogeográficas, el Chocó ecuatoriano y la cordillera Occidental, en donde hay parches de bosque primario húmedo tropical, pero ha habido cambios en el uso de la tierra, principalmente por la actividad agropecuaria y la urbanización de zonas rurales (27).

Cuadro 1. Localidades de estudio en el noroccidente de Pichincha, Ecuador

Localidad/ Cantón	Altitud (msnm)	Coordenadas	Precipitación anual (mm)	Zona de vida con acción sinantrópica
Milpe San Miguel de los Bancos	1.200	00° 02' 19,6'' N 78° 52' 37,6'' O	1.000 a 2.000	Bosque muy húmedo premontano
Mashpi/Pacto	558	00° 10' 29,4'' N 78° 54' 28,5'' O	1.800 a 2.000	Bosque siempreverde piemontano
Vía El Progreso/ Pedro Vicente Maldonado	550	00° 04' 26,5'' N 79° 02' 57,3'' O	1.000 a 2.000	Bosque muy húmedo premontano
Puerto Rico/Puerto Quito	329	00° 05' 33,4'' N 79° 14' 33,0'' O	2.000 a 4.000	Bosque muy húmedo premontano
Isla/Puerto Quito	122	00° 06' 46,4" N 79° 13' 55,5" O	2.000 a 4.000	Bosque muy húmedo premontano

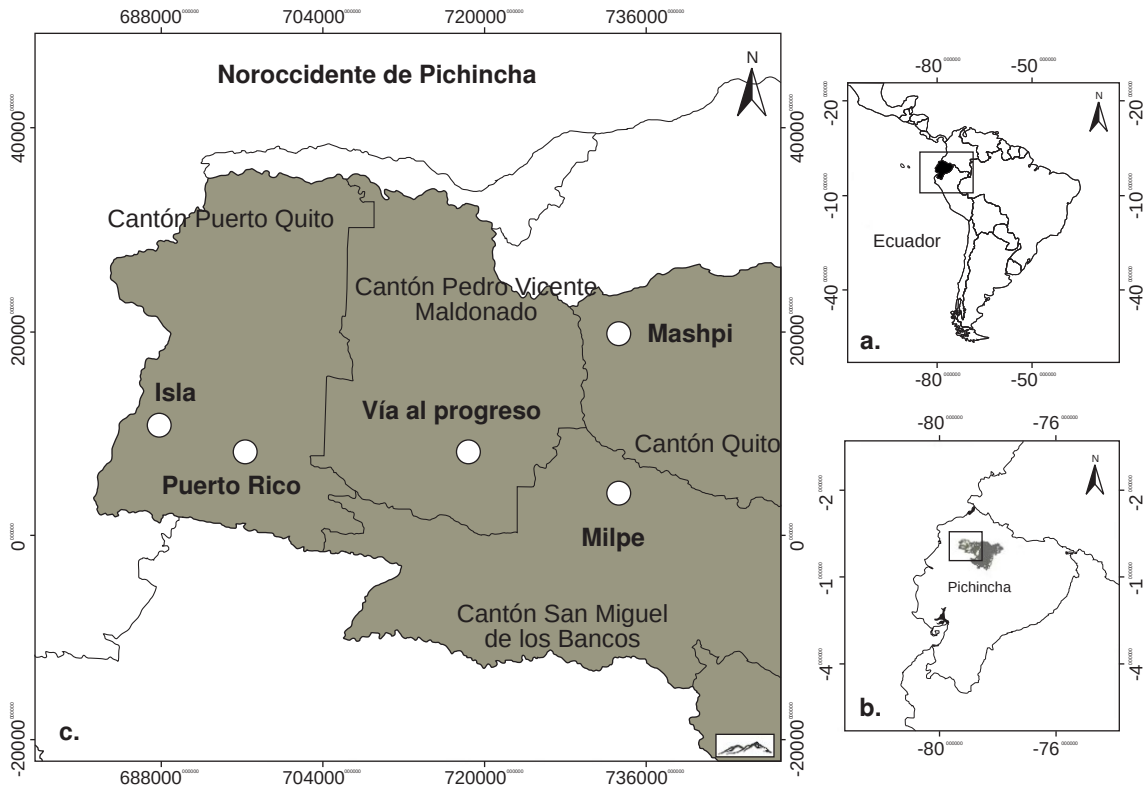


Figura 1. Ubicación geográfica de las cinco localidades de estudio (círculos blancos) en el noroccidente de Pichincha, Ecuador

Las condiciones climáticas de las cinco localidades son similares (28), con variaciones térmicas diarias entre los 17 y los 25 °C, altos niveles de precipitación entre los meses de mayo y julio (260 a 320 mm), y mínimos, entre agosto y marzo (140 a 220 mm); mayo es el mes de mayor precipitación promedio (320 mm), en tanto que en agosto la precipitación es intermedia (220 mm), y en noviembre se registra la menor (190 mm).

Recolección de los flebotomíneos

La recolección se hizo con trampas CDC de luz blanca (27 trampas durante tres noches por localidad y por mes entre las 18:00 y las 06:00 horas), durante los meses de julio y agosto de 2013 y mayo de 2014. Se hicieron tres muestreos: uno para evaluar la infección natural y los otros dos para estudiar los aspectos ecoepidemiológicos de sinantropía y endofagia. Las trampas se ubicaron en cuatro tipos de hábitats: vivienda (intradomicilio), peridomicilio (3 a 60 m de distancia de la vivienda), bosque (el más cercano a la vivienda) y cultivos (papa china, yuca, plátano o cacao), en un gradiente altitudinal de 122 a 1.200 msnm (cuadro 1) dividido en tres categorías: alta (1.200 m), intermedia (500 a 558 m) y baja (122 a 329 m). Las hembras de flebotomíneos que se posaban sobre los investigadores durante la revisión nocturna de las trampas, se recolectaron con aspiradores manuales.

Identificación de los flebotomíneos

Los ejemplares se separaron individualmente por sexo. Se utilizó la clave taxonómica de Young, *et al.* (14). Las hembras identificadas como *Lu. reburra*, *Lu. trapidoi* y *Lu. barrettoi majuscula* con base en las características del cibario y los genitales, se seleccionaron para la detección molecular de *Leishmania* spp.

Extracción del ADN de los flebotomíneos

Los ejemplares de flebotomíneos almacenados de forma individual en tubos de 1,5 ml a –80 °C, se hidrataron durante 24 horas a temperatura ambiente en 300 µl de solución tampón de hidratación (100 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, SDS al 0,5 %, 200 mM de sacarosa), según el protocolo de Golczer, *et al*. (29). Para la extracción del ADN se siguió el protocolo de Echeverría, *et al.* (30). Las modificaciones consistieron en agregar 20 µl de proteinasa K en 100 µl de la solución tampón de extracción para incubar cada muestra durante una hora a 60 °C y a 1.300 rpm, y luego a 100 °C

y a 900 rpm durante 10 minutos. Por último, se centrifugó durante cinco minutos a 13.000 rpm, se descartó el *pellet* y el sobrenadante se almacenó a –20 °C hasta su posterior amplificación.

Amplificación y secuenciación del ITS1 de Leishmania

Se amplificó el fragmento ITS-1 de *Leishmania*; se utilizaron los cebadores 100 µM LITSR 5'- CTGG ATCA-TTTTCCGATG - 3' y L5.8S 5' - TGATACCAC TTATCG-CACTT - 3' (22). Como control positivo interno se utilizó ADN de *Lu. trapidoi* previamente amplificado para *Leishmania* y, como control positivo externo, extracto de ADN de la cepa MHOM/BZ/82/BEL21 de *Le. mexicana*. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplearon: 25 µl por reacción de solución tampón 5X; 2,5 mM de MgCL; 100 µM de cada cebador; 10 mM de dNTP; 0,2 µl de Taq ADN polimerasa y 3-4 µl de ADN total extraído de los abdómenes de hembras de las tres especies de flebotomíneos con el programa de 40 ciclos de cinco minutos a 95 °C, 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, un minuto a 72 °C y 10 minutos a 72 °C. Los amplicones de 300 pb se visualizaron en geles de agarosa al 2 % (w/v). Los productos de la PCR se secuenciaron de forma automatizada y directa por Macrogen, utilizando los mismos oligonucleótidos de la PCR.

Identificación de las secuencias del ITS-1 de Leishmania

Las secuencias de ADN se compararon con las del *ITS1* del ADN de *Leishmania* disponibles en GenBank por identidad genética mediante búsqueda en la *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

En la segunda fase, las secuencias se alinearon utilizando Clustal W (31) en la aplicación Mac Vector, Inc, ver. 14.5.3 (#9000566 a SCW y JCN) y ajustes manuales. Para el alineamiento basado en homologías, se consideraron valores altos de penalización (15 para la creación y la extensión de las *gap*). Se utilizaron las siguientes secuencias del *ITS1* de *Leishmania* reportadas en GenBank como referencias de *Leishmania* neotropicales: *Le. amazonensis* (gi806777491, kp274862), *Le. mexicana* (gi577861716), *Le. braziliensis-Lbrasil-104* (gi806777492), *Le. guyananesis* (gi685205147), *Le. lainsoni* (gi577861646), *Le. naiffi-lainsoni42* (gi76577722), *Le. panamensis* (gi227976411), *Le. peruviansis* (gi577861653), *Le naiffi*, *Le. sp* (gi262652965) y *Le. siamens* (367461079). Además, se incluyeron las siguientes secuencias de *Leishmania* del Viejo Mundo pertenecientes al subgénero *Leishmania* como grupo externo: *Le. tropica* (gi577861678), *Le. major* (gi687045625), *Le. donovani* (gi577861702) y *Le. infantum* (gi10303005103).

Como criterio preliminar de diferenciación entre las secuencias de *Leishmania* spp., se recurrió a un análisis de similitud global mediante el método de unión de vecinos (*Neighbor Joining*, NJ) (32) y bajo los supuestos del modelo Kimura2P para los cálculos de distancia genética (K2P) mediante el programa PAUP 4.0a149, 2016 (33).

Por último, las secuencias se analizaron con un criterio filogenético, utilizando el análisis de máxima parsimonia derivado de la presencia de datos informativos o sinapomorfias. Los caracteres se trataron con igual ponderación y, posteriormente, se pesaron de nuevo con base en el índice de consistencia recalculada (RCI) mediante una búsqueda heurística de 1.000 réplicas iniciales con barrido de ramas, utilizando la bisección y la reconexión de árboles (*Tree Bisection-Reconnection*, TBR). Como soporte de los grupos o clados, se utilizó el método de *bootstrap* con 10 réplicas de adición al azar por 500 'pseudorréplicas de remuestreo', eliminando los caracteres no informativos (34,35).

Amplificación, secuenciación e identificación de las topoisomerasas II mitocondrial y nuclear de Leishmania spp.

El fragmento caracterizado de la topoisomerasa II mitocondrial (mtTOPO II) se amplificó usando los oligonucleótidos LmxM15.1290 - F1 (AAGGA GATGG TGCACTTC; posición a 2.011 pb desde el inicio del gen) y LmxM15.1290-R1 (TCCATGTAG TCCAGGAGT; posición a 2.399 pb desde el inicio del gen). El fragmento mtTOPOII comprende los nucleótidos del 2.097 al 2.389. Con el gen *mtTOPOII* se evaluaron 26 muestras de ADN extraído de flebotomíneos positivos para *Leishmania* mediante amplificación previa del *ITS1*.

Para la amplificación del gen *TOPOII* se utilizaron los oligonucleótidos LmxM.28.2280 - F1 (AAGC GCAACTTGGTGAACTC), ubicados a 2.101 pb desde el inicio del gen, y LmxM.28.2280 - R1 (ATGAGCCGGGTGAAGATGTA), ubicados a 2.330 pb desde el inicio del gen. Ambos pares de oligonucleótidos se diseñaron en el presente estudio. Para la amplificación se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen Taq DNA polymerase), con 25 µl por reacción: solución tampón 1X; 5 mM de

$MgSO_4$; 0,2 mM de cada cebador; 0,2 mM de dNTP; 0,2 µl de Taq ADN polimerasa, y 3 µl de ADN total extraído de flebótomos positivos para *Leishmania* spp., según lo determinado en la amplificación de la región ITS-1 con el programa de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, y un minuto a 72 °C. Los amplicones se enviaron a Macrogen y se secuenciaron de forma directa con los mismos cebadores de la amplificación.

Las secuencias alineadas y los análisis de similitud global se hicieron bajo los mismos criterios del análisis de la región ITS-1. Sin embargo, las secuencias de mtTOPOII y de TOPOII de las siguientes especies de *Leishmania,* empleadas como referencia para el análisis, se obtuvieron de la base de datos pública GeneDB (36): *Le. infantum* (LinJ.15.1310), *Le. major* (LmjF.15.1290), *Le. donovani* (LdBPK_151310.1), *Le. braziliensis* (LbrM.15.1230), *Le. mexicana* (LmxM.15.1290) y *Le. amazonensis* (>A20130 |DNA_1 220..3930|.|-|.|Scaffold871); la secuencia de *Leishmania amazonensis* se obtuvo de GeneLGE. Sin embargo, no se hicieron análisis de parsimonia debido a la ausencia de sinapomorfias en las secuencias de ADN obtenidas para los dos tipos de topoisomerasas.

Cálculo de porcentaje de positividad para Leishmania

Se calculó el porcentaje de positividad para *Leishmania* del número total de especies de flebotomíneos y de cada una de ellas en particular por localidad, intervalo de altitud, hábitat y precipitación en el mes de recolección. El porcentaje se calculó estableciendo la proporción del número de hembras positivas con relación al número de hembras procesadas mediante PCR, de manera que si todas las hembras recolectadas se procesaran, el porcentaje de positivas equivaldría a la tasa máxima de infección. Para las muestras en las que no se procesaron todas las hembras recolectadas, este cálculo correspondió a la tasa de infección mínima (37).

Cálculo de la endofagia

El valor de la endofagia para las tres especies de flebotomíneos se calculó, según Santamaria, *et al*. (9), en función del número de ejemplares capturados en el intradomicilio dividido por el número de ejemplares capturados en el peridomicilio, lo cual indica la proporción de ejemplares del peridomicilio que podrían entrar a la vivienda.

Cálculo de la sinantropía

Se calculó el valor de la sinantropía para las tres especies de flebotomíneos según el método de Figueroa-Roa, *et al*. (38), modificado para la escala de distribución microespacial del presente trabajo, así: 2 x el porcentaje de ejemplares recolectados en la vivienda + porcentaje de ejemplares recolectados en el peridomicilio – 2 x el porcentaje de ejemplares recolectados en el bosque/2. El índice de sinantropía varía de +100 a -100. Los valores positivos indican que una especie está asociada al ambiente humano, específicamente a las viviendas (intradomicilio), en tanto que los valores negativos indican que las especies evitan este ambiente. Los valores numéricos mínimos son el cero, el valor intermedio es 50 y un valor de 100 representa el máximo valor numérico para este índice, independientemente de su signo.

Análisis estadístico

La asociación entre la variable del porcentaje de positividad para *Leishmania* en flebotomíneos (total y para cada una de las tres especies estudiadas), y las variables de localidad, hábitat, intervalo de altitud y precipitación por mes de muestreo, se evaluaron mediante la prueba estadística de ji al cuadrado (χ^2), usando el programa estadístico SPSS®, versión 15.0 (39).

Resultados

Diagnóstico molecular de Leishmania

Se recolectaron 26 especies pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae en el gradiente altitudinal estudiado (no se presentan los datos). Solo tres especies, *Lu. trapidoi*, *Lu. reburra* y *Lu. b. majuscula*, se seleccionaron para el diagnóstico molecular de la infección natural por *Leishmania* spp. en hembras procesadas de forma individual que no habían ingerido sangre ni portaban huevos. *Lutzomyia trapidoi* se seleccionó por ser la especie más abundante durante el muestreo y vector comprobado en el noroccidente de Pichincha. Se procesó el 4 % (124 hembras) de los ejemplares recolectados de esta especie. *Lutzomyia reburra* se seleccionó por ser una especie dominante y la segunda en abundancia después de *Lu. trapidoi* en varias de las localidades; se procesaron todos los individuos (50 hembras). *Lutzomyia b. majuscula* se seleccionó porque ha sido asociada a las cuevas de armadillos y en este estudio fue la especie de mayor abundancia espacial entre aquellas de menor abundancia (1 %); se procesaron todos los individuos (47 hembras).

Se detectó infección por *Leishmania* en las tres especies de flebotomíneos en función del gen *ITS1*, evidenciándose la presencia de una banda

de 300 pb en la muestra de control (cultivo de *Leishmania*), similar a la banda amplificada a partir de las muestras del abdomen de las hembras (figura 2).

Porcentaje de positividad para Leishmania a escala espacio-temporal con base en el ITS1

Localidad. Los porcentajes de positividad fueron mayores para el total de flebotomíneos en la localidad de La Isla, y solo las hembras de dos especies estaban infectadas, con un porcentaje de positividad en *Lu. reburra* mayor que el de *Lu. b. majuscula*. La siguiente localidad con mayor porcentaje de positividad total fue Milpe, km 91, donde se encontraron tres especies con infección natural; dicho porcentaje fue mayor en *Lu. trapidoi,* seguido de *Lu. reburra* y de *Lu. b. majuscula*. En las localidades de Mashpi, Puerto Rico y Pedro Vicente Maldonado, se obtuvieron porcentajes de positividad asociados a la presencia de una sola especie de flebotomíneo. En Mashpi se encontró *Lu. b. majuscula*, en tanto que *Lu. trapidoi* se encontró en las dos últimas localidades mencionadas (figura 3a). Las diferencias en el porcentaje de positividad total por localidad se confirmaron estadísticamente (χ^2=15,01; gl=4; p=0,005). Sin embargo, la diferencia en dicho porcentaje por especie en las localidades no fue estadísticamente significativa para ninguna de las especies estudiadas: *Lu. trapidoi*, *Lu. b. majuscula* y *Lu. reburra* (χ^2=2,63, gl=4, p=0,652; χ^2 = 5,76, gl=4, p=0,214; y χ^2=7,82, gl=4, p=0,154, respectivamente).

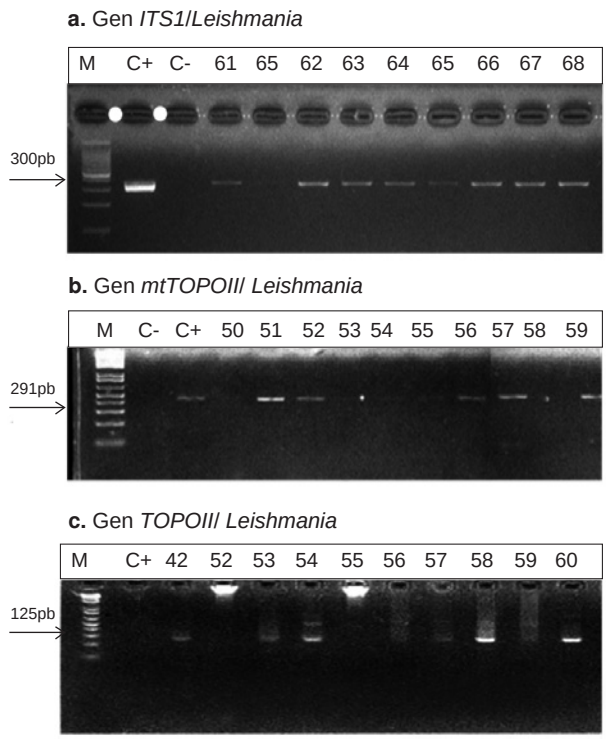


Figura 2. Geles de agarosa al 2 %. **a)** *ITS1*; **b)** mtTOPOII, y **c)** *TOPOII* de *Leishmania* spp., amplificadas a partir de ADN de flebotomíneos. Los números sobre cada carril corresponden al número de cada muestra de ADN evaluada. *ITS1*: gen espaciador interno de la transcripción del ARN ribosómico, unidad 1; *mtTOPOII*: gen de la topoisomerasa I mitocondrial; *TOPOII*: gen de la topoisomerasa II nuclear; M: marcador molecular de 100 pb; C +: control positivo de ADN de *Leishmania;* C -: control negativo

Hábitat. El mayor porcentaje de positividad total para *Leishmania* se encontró en el peridomicilio, seguido del intradomicilio, el bosque y los cultivos. En las viviendas se encontraron dos especies positivas para *Leishmania*: *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*. En el peridomicilio y en el bosque, se encontraron las tres especies con infección natural*,* pero con diferentes porcentajes de positividad. La mayor positividad en el peridomicilio la presentó *Lu. b. majuscula* y, en el bosque, *Lu. trapidoi.* En los cultivos, principalmente los de cacao, solo *Lu. trapidoi* resultó con infección, con un porcentaje de positividad comparativamente bajo (10 % aproximadamente, figura 3b). En general, se observó una tendencia a registrar mayores porcentajes de positividad para *Leishmania* en los ambientes transformados por el hombre (vivienda y peridomicilio) (figura 3b). Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de positividad total por hábitat no fueron confirmadas estadísticamente (χ^2=1,6: gl=3: p=0,67). Asimismo, no se confirmaron estadísticamente las diferencias aparentes entre el porcentaje de positividad por especie de flebotomíneo según el hábitat (*Lu. trapidoi*: χ^2=4,47, gl=3, p=0,21; *Lu. reburra*: χ^2=2,99, gl=2, p=0,25, y *Lu. b. majuscula*: χ^2=3,03, gl=2, p=0,27).

Altitud. En la altitud intermedia (500 a 550 msnm), el porcentaje de positividad para *Leishmania* se debió a la presencia de dos especies de flebotomíneos con infección natural, *Lu. trapidoi* y *Lu. b. majuscula*. En la altitud extrema (1.200 msnm) o en la más baja (122 a 329 msnm), las tres especies se encontraron infectadas con porcentajes de positividad diferentes. En la altitud máxima, la especie con mayor positividad fue *L. trapidoi*, seguida de *Lu. b. majuscula* y de *Lu. reburra*. Por el contrario, en la menor altitud, la especie con mayor positividad fue *Lu. b. majuscula* seguida de *Lu. reburra* y de *Lu. trapidoi* (figura 3c). Las diferencias mencionadas en el porcentaje de positividad total por altitud se confirmaron estadísticamente (χ^2=8,7; gl=2; p=0,01). Sin embargo, por especie de flebotomíneo solo se

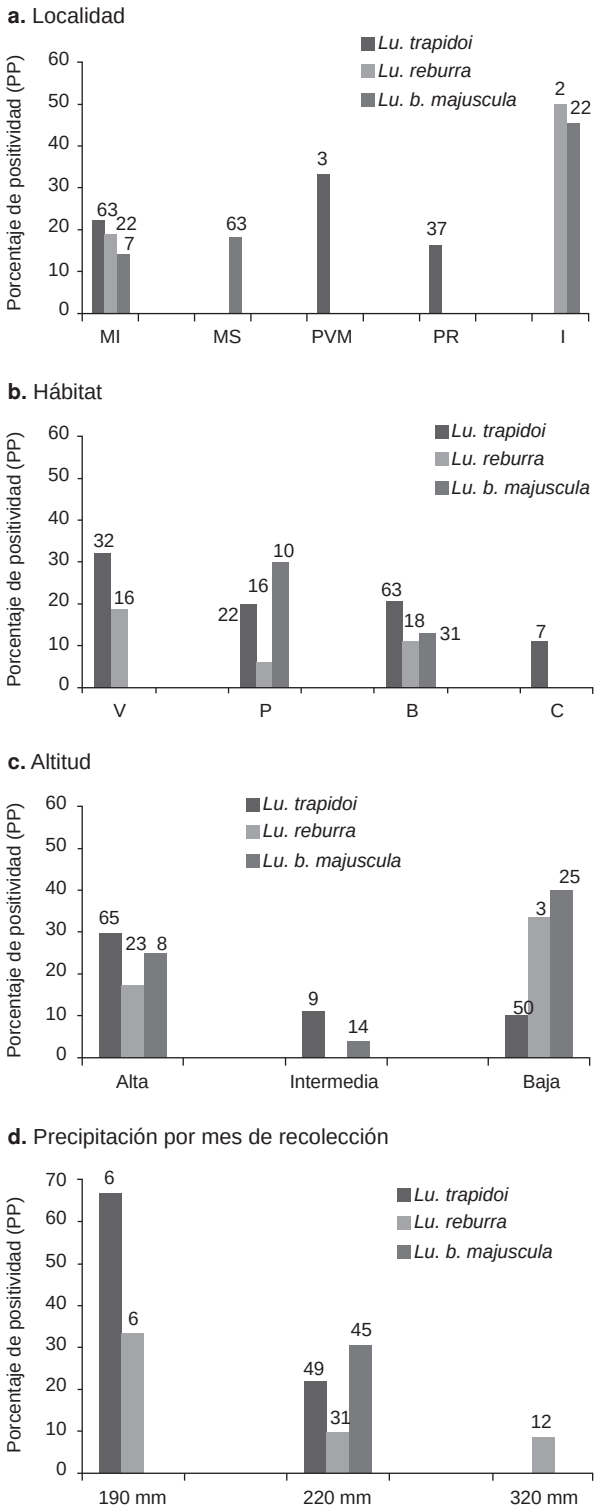


Figura 3. Distribución del porcentaje de positividad para *Leishmania* en tres especies de *Lutzomyia* según: **a)** localidad, **b)** hábitat, **c)** altitud y **d)** precipitación por mes de recolección. MI: Milpe; MS: Mashpi; PVM: Pedro Vicente Maldonado; PR: Puerto Rico; I: Isla; V: vivienda-intradomicilio; P: peridomicilio; B: bosque; C: cultivos. El número sobre cada barra representa el número de hembras analizadas con base en el *ITS1*.

confirmaron estadísticamente las diferencias en los porcentajes de positividad según la altitud para *Lu. reburra* (χ^2=6,0; gl=2; p=0,05).

Precipitación. En noviembre, el mes de menor precipitación, se registró el mayor porcentaje de positividad total de hembras de dos de las especies: *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*. En agosto, mes con niveles intermedios (220 mm) de precipitación, se registró el segundo mayor porcentaje de positividad total para *Leishmania* en las tres especies, siendo el porcentaje de positividad de *Lu. b. majuscula* mayor que el de *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*. Por el contrario, en mayo, el mes de mayor precipitación, con 320 mm, la única especie recolectada en la que se encontró infección por *Leishmania* fue *Lu. reburra* (figura 3d). Las diferencias mencionadas entre las variables del porcentaje de positividad total y la precipitación, se confirmaron estadísticamente (χ^2=11,5; gl=2; p<0,001). Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de positividad por especie de flebotomíneo en relación con la precipitación no fueron estadísticamente significativas (*Lu. trapidoi*: χ^2=2,37, gl=2, p=0,41; *Lu. reburra*: χ^2=0,59, gl=2, p=1,0; *Lu. b. majuscula*: χ^2=0,91, gl=2, p=1,0).

Identificación molecular de Leishmania con base en el fragmento ITS-1

Los análisis de las secuencias del *ITS1* permitieron tipificar bajo un criterio filogenético la determinación taxonómica de tres especies de *Leishmania.* La primera correspondió a *Le. amazonensis*, la especie de parásito más abundante (83 %), presente en *Lu. reburra*, *Lu. barrettoi majuscula* y *Lu. trapidoi*. El árbol filogenético evidenció la existencia de una politomía en el nodo D, y no se encontraron linajes en la especie *Le. amazonensis*, independientemente de la localidad muestreada y de la especie de flebotomíneo (figura 4).

Leishmania braziliensis (4,7 %) se detectó en la localidad de Puerto Rico, y se determinaron filogenéticamente dos secuencias diferentes sin divergencia nucleotídica, lo cual indica que pertenecen a un mismo grupo monofilético, representado por el nodo B21. Una tercera especie de *Leishmania* se detectó en la localidad de Milpe con base en una sola secuencia amplificada, y se identificó como *Le. naiffi-Le. lainsoni* (2,3 %) por su identidad con la secuencia de referencia del Genbank agrupada en el nodo B22. Las dos especies de *Leishmania* detectadas solo se encontraron en *Lu. trapidoi* (figuras 4 y 5).

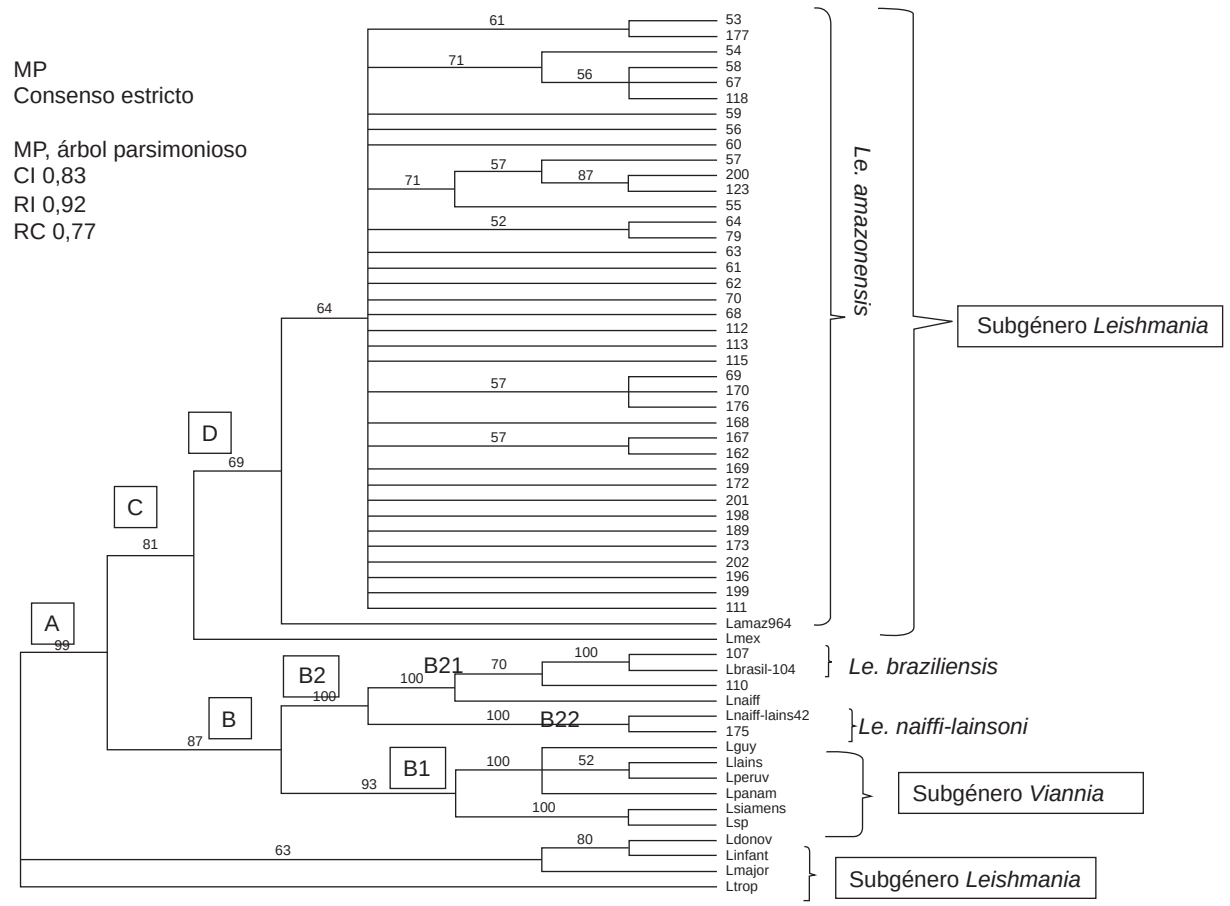


Figura 4. Análisis filogenético de máxima parsimonia (MP), consenso estricto. Secuencias del *ITS1* de *Leishmania* obtenidas de amplificaciones a partir de *Lu. trapidoi*, *Lu. reburra* y *Lu. b. majuscula.* A, B, C, D, B1, B2, B21 B22 son nodos del árbol.

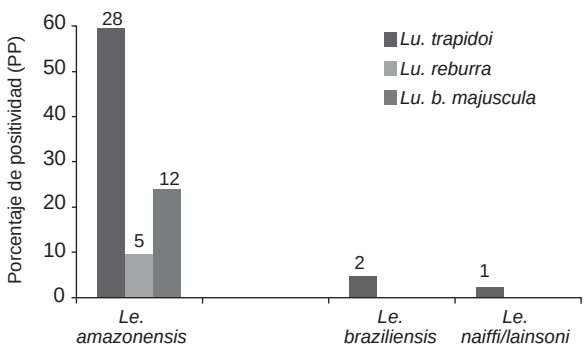


Figura 5. Porcentaje de positividad según la especie de *Leishmania* tipificada con base en el *ITS1* en tres especies de *Lutzomyia*. El número sobre cada barra representa el número de hembras de *Lutzomyia* analizadas.

Identificación de Leishmania con base en el fragmento de mtTOPOII

El 61,5 % de las muestras seleccionadas a partir de aquellas positivas con base en el *ITS1*, y amplificadas con base en el *mtTOPOII*, correspondieron a 16 secuencias de 292 pb pertenecientes a las tres especies de flebotomíneos (figura 6a). El análisis de similitud global (NJ) evidenció que 15 de las 16 secuencias obtenidas eran idénticas y pertenecían a un mismo haplogrupo del subgénero *Leishmania,* y se asociaban específicamente por similitud global con secuencias de *Le. amazonensis* (figura 6a). Una secuencia del *mtTOPOII*, amplificada a partir de una muestra de *Lu. trapidoi* y denominada como secuencia MT107, se asoció al grupo del subgénero *Viannia* y se identificó como *Le. braziliensis* (figura 6a).

Identificación de Leishmania con base en el fragmento TOPOII

En el análisis de similitud global se evidenció que todas las 13 secuencias analizadas de este gen fueron idénticas y pertenecían a un genotipo distinto del de las secuencias de *Le. mexicana* presentes en el grupo del subgénero *Leishmania*. Las secuencias se tipificaron como *Le. amazonensis* con base en el *ITS1* y la topoisomerasa mtTOPOII. Sin embargo,

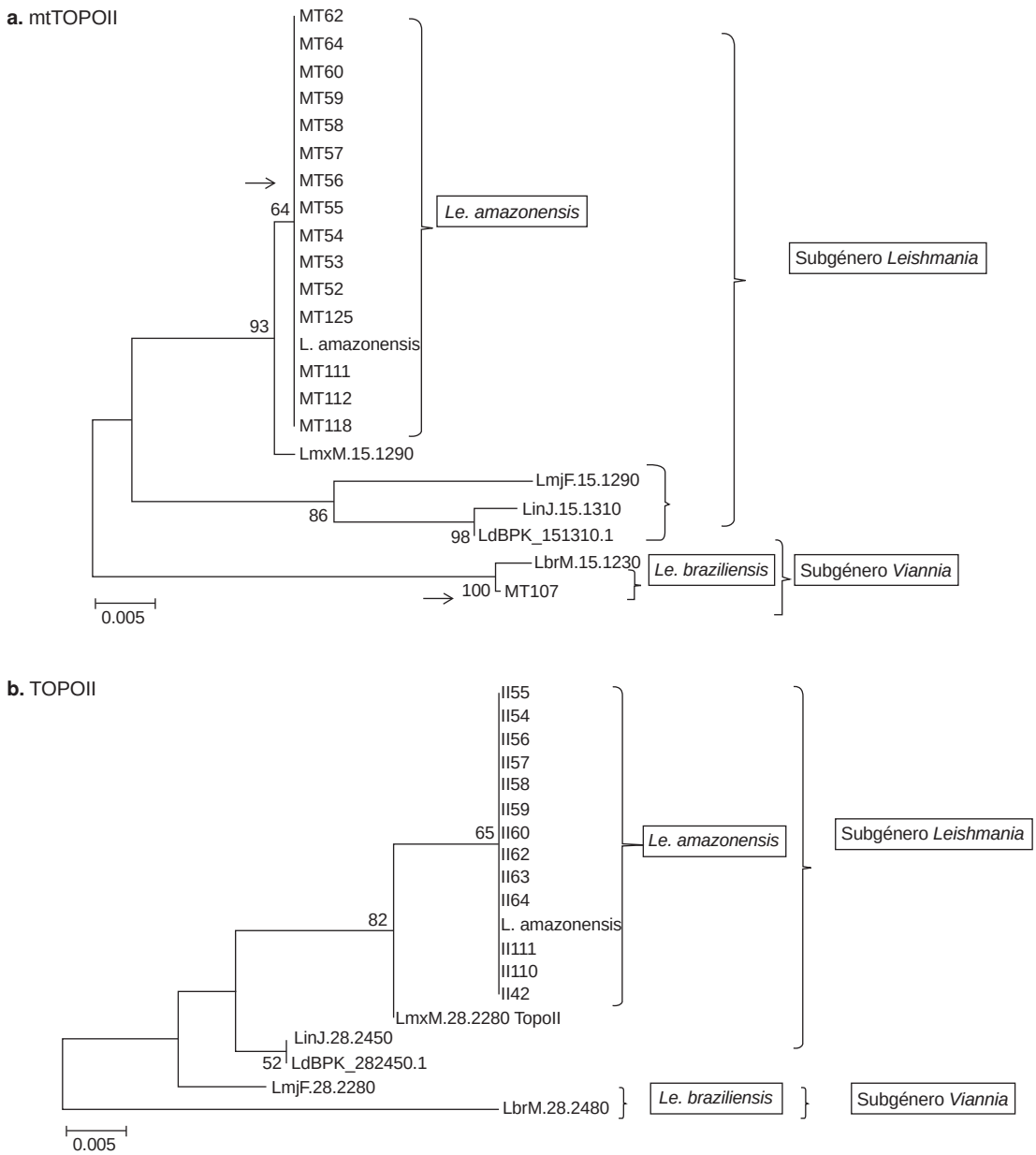


Figura 6. Análisis de similitud global (NJ) de las secuencias de dos topoisomerasas de *Leishmania:* **a)** topoisomerasa I mitocondrial (mtTOPOII), y **b)** topoisomerasa II nuclear (TOPOII). Las flechas indican las dos secuencias-linajes para mtTOPOII.

no se observaron cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína, en contraste con las secuencias obtenidas para mtTOPOII, en las cuales la variación nucleotídica del gen se tradujo en cambios en las secuencias de aminoácidos de la topoisomerasa mitocondrial (no se muestran los datos) (figura 6b).

Los resultados de la identificación por similitud global de una secuencia de *Leishmania* denominada como MT110 y detectada en un ejemplar de *Lu. trapidoi* recolectado en Puerto Rico, no fueron congruentes. Los análisis con el *ITS1* mostraron que esta secuencia es cercana filogenéticamente a *Le. naiffi* y *Le. braziliensis*, en tanto que, con base en la mtTOPOII, se agrupó con *Le. amazonensis* (figura 5b). Por esta razón, no se la incluyó en los análisis de tipificación de *Leishmania* a la espera de otros análisis.

Endofagia. El valor más alto de endofagia (0,38) se obtuvo para *Lu. reburra* (24/62 individuos, intradomicilio/peridomicilio), seguido por *Lu. trapidoi* (0,15) (57/370), en tanto que para *Lu. b. majuscula,* dicho valor fue de cero (0/10).

Sinantropía. Todas las especies resultaron ser asinantrópicas con respecto al área de la vivienda, pues los valores fueron negativos. Sin embargo, *Lu. reburra* presentó el valor menos negativo (-10,1) comparado con los de *Lu. b. majuscula* (-72,7) y *Lu. trapidoi* (-69,3).

Discusión

Se detectó *Leishmania* en *Lu. reburra*, *Lu. barettoi majuscula* y *Lu. trapidoi* mediante el análisis concordante de *ITS1*, mtTOPOII y TOPOII, lo cual evidencia el potencial de las topoisomerasas para la tipificación de la infección natural por *Leishmania* en flebotomíneos.

Los porcentajes de positividad para *Leishmania* fueron significativamente altos en cada especie, siendo comparables con los de *Leishmania* en flebotomíneos neotropicales, los cuales oscilan entre 6,9 y 92,8 %. En el caso de *Lu. reburra* y *Lu. barrettoi majuscula*, los valores del porcentaje de positividad correspondieron a la tasa de infección máxima, es decir, 12 y 31,1 %, respectivamente, ya que se procesaron todas las hembras recolectadas de forma individual. Por el contrario, los porcentajes de positividad de *Lu. trapidoi* correspondieron a la tasa mínima de infección natural debido a que solo se procesó el 4 % de las hembras; los valores de infección natural encontrados estuvieron dentro del intervalo de tasa mínima de infección para el diagnóstico molecular en flebotomínos neotropicales, principalmente los antropofílicos, la cual oscila entre 0,06 y 3,9 % (8-13,37,40-45).

Los altos valores de positividad registrados en el presente estudio podrían explicarse por la gran diversidad de la fauna silvestre que puede servir de reservorio en el Chocó ecuatoriano, al cual pertenece biogeográficamente la región del noroccidente de Pichincha, donde, a pesar del grado de intervención de los bosques, hay una diversidad comparativamente mayor a la de otros focos de las zonas andinas (15), lo que favorece el solapamiento del nicho ecológico espacio-temporal de los flebotomíneos y los huéspedes potenciales de *Leishmania*. La ausencia de una estacionalidad acentuada de las variables de precipitación y temperatura, con la presencia de periodos largos (ocho meses) de poca precipitación mensual (149 a 220 mm) y periodos cortos (cuatro meses) de alta precipitación mensual (240 a 320 mm), favorece la persistencia de las poblaciones de estos tres flebotomínos en la zona de muestreo, siendo la precipitación una variable macroclimática aparentemente importante para la dinámica de transmisión de la leishmaniasis (20).

En el noroccidente de Pichincha, la circulación de las especies detectadas de *Leishmania* se da entre los meses de agosto y mayo, lo que equivale, por lo menos, a una presencia de *Leishmania* durante 83,3 % del año. Desde el punto de vista ecoepidemiológico, noviembre es el mes de máxima positividad para *Leishmania* y, en consecuencia, la máxima transmisión debería registrarse antes del inicio del periodo de mayor precipitación, cuando la abundancia de hembras infectadas baja significativamente.

La mayor abundancia de hembras positivas se asoció, aparentemente, a los ambientes con actividad de construcción de vivienda, lo que sugiere un ciclo doméstico de transmisión asociado a la vivienda rural, principalmente en el peridomicilio. De ahí la necesidad de adoptar medidas de prevención y control de vectores en este hábitat. Sin embargo, este mayor riesgo de picaduras infectivas en el intradomicilio debe confirmarse, pues no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de positividad para *Leishmania* y la variable de hábitat.

La detección molecular de la infección natural en *Lu. trapidoi*, con una positividad para *Leishmania* de 23,3 %, evidenció el papel de esta especie como vector en la región de la sierra ecuatoriana (2,7,13) donde *Lu. trapidoi* se ha encontrado con infección natural por *Le. panamensis*, *Le. naiffi*, *Le. guyanensis y Le. panamensis/guyanensis* (6-7,13).

En el presente trabajo se encontró infección natural con tres especies de *Leishmania* pertenecientes a dos subgéneros: *Leishmania (Le. amazonensis)* y *Viannia (Le. braziliensis y Le. naiffi-lainsoni),* especies detectadas por primera vez en *Lu. trapidoi,* lo cual es indicativo de su papel como vector potencial. Además, este resultado representa el primer registro de *Le. amazonensis* en la sierra ecuatoriana, pues antes solo se había registrado en la región de la costa ecuatoriana (7,13).

Asimismo, se registra por primera vez en Ecuador la presencia del híbrido de *Leishmania Le. naiffi-lainsoni*, lo cual sugiere la circulación de *Le. naiffi* y *Le. lainsoni* en el noroccidente de Pichincha (21), especies estas registradas previamente solo en la Amazonia ecuatoriana, y explicaría por qué la región de la sierra es una zona ecológica para el intercambio genético entre estas especies de *Leishmania* (43).

Leishmania braziliensis se ha encontrado en la provincia de Pichincha en pacientes con leishmaniasis cutánea en las localidades de San Miguel

de Los Bancos, Puerto Quito y Pedro Vicente Maldonado; esta especie se había registrado ya en la Amazonia y en la costa ecuatoriana (21). En el presente estudio, se detectó en ejemplares de *Lu. trapidoi* recolectados en la localidad de Puerto Rico. Así, se propone a *Lu. trapidoi* como el vector primario de *Le. braziliensis* en la provincia de Pichincha, región de la sierra, dada la presencia, en esta misma zona, de casos clínicos de leishmaniasis en humanos causados por la misma especie de *Leishmania.*

Además, se detectó por primera vez la infección natural por *Le. amazonensis* en *Lu. reburra* y *Lu. b. majuscula,* siendo la especie de mayor abundancia en la zona de muestreo; se detectó, asimismo, en *Lu. trapidoi* con un alto porcentaje de infección (59,5 %), lo cual evidencia la importancia de este flebotomíneo como vector primario debido a su dominancia, antropofilia y amplia distribución espacial en el gradiente altitudinal en aquellos focos más activos y de mayor incidencia de leishmaniasis cutánea, como Pedro Vicente Maldonado (PVM-vía El Progreso) y Puerto Quito (Puerto Rico).

En cuanto a los valores de endofagia y sinantropía, y a la amplia presencia de los flebotomíneos con infección por *Le. amazonensis*, *Lu. trapidoi* presentó valores significativamente menores en comparación con *Lu. reburra,* lo cual sugiere que constituye un vector potencial secundario de *Le. amazonensis* dado su porcentaje de positividad (9,5 %), una presencia más prolongada de hembras infectadas (40 %) en las localidades, y su comportamiento zoofílico y antropofílico (se recolectaron hembras de forma incidental durante los muestreos de *Lu. trapidoi*).

Lutzomyia reburra se encontró en gran abundancia en las localidades de Milpe y La Isla. En Milpe, la incidencia de leishmaniasis cutánea en humanos ha sido menor que en Pedro Vicente Maldonado y Puerto Quito (7). Por el contrario, en la localidad de La Isla no se han registrado casos de leishmaniasis cutánea según los informes de la propia comunidad en las encuestas sobre conocimientos, aptitudes y prácticas en torno a la leishmaniasis. Así, se registró circulación de *Le. amazonensis* sin que, aparentemente, se hayan dado casos clínicos en humanos asociados a esta especie en el noroccidente de Pichincha (21).

Por otro lado, a pesar de que las hembras infectadas de *Lu. b. majuscula* presentaron un mayor porcentaje de positividad para *Le. amazonensis (*23,8 %*)* que *Lu. reburra* (9,5 %), su importancia vectorial posiblemente se restringe a un periodo específico, ya que solo se recolectaron adultos en agosto, durante el periodo de menor precipitación.

Desde el punto de vista espacial, las hembras infectadas de *Lu. b. majuscula* se encontraron en 60 % de las localidades muestreadas, principalmente en el peridomicilio y en el bosque, y con un comportamiento de picadura exofílico y exofágico, derivado de su preferencia por alimentarse con sangre de animales silvestres, lo cual la cataloga como zoofílica, al menos en las localidades estudiadas.

Los resultados de este estudio sugieren la existencia de dos ciclos de transmisión de *Le. amazonensis* en la sierra ecuatoriana. El primero es un ciclo enzoótico, mantenido potencialmente por, al menos, tres especies de flebotomínos: 1) *Lu. trapidoi,* vector primario si se atiende a su abundancia relativamente alta, a la elevada tasa de infección natural, a su dominancia y a la amplia distribución espaciotemporal en el noroccidente de Pichincha; 2) *Lu. reburra,* vector secundario debido a su menor dominancia, la amplitud intermedia de su distribución espacial, y a la mayor presencia espacial de hembras infectadas comparada con *Lu. Trapidoi*, y 3) *Lu. b. majuscula*, vector terciario según su tasa de infección natural, menor distribución espaciotemporal y solapamiento con *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra* en el mes de mayor porcentaje de positividad para *Leishmania*. El segundo ciclo es doméstico, y en su transcurso *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra* serían los vectores responsables de la translocación de *Le. amazonensis* del ciclo de transmisión silvestre al ciclo de transmisión doméstico, dado el mayor riesgo de endofagia en el peridomicilio.

Se ha señalado que el ciclo de *Le. amazonensis* en focos endémicos depende de las especies dominantes primarias o secundarias (21), pero para confirmar esta hipótesis es necesario evaluar en campo, entre otras variables ecológicas, la preferencia alimentaria, la tasa de picadura y la actividad nocturna. La presencia de ADN de *Leishmania* en el abdomen de una hembra evidenció que hubo multiplicación del parásito en el mesenterón, lo que desde el punto de vista biológico es clave cuando se evalúa el papel de una especie de flebotomíneos como vector local.

Por último, será necesario hacer seguimiento activo de los pacientes para la detección y la tipificación de *Le. amazonensis*, ya que no solo está implicada en los casos humanos de leishmaniasis cutánea en el Neotrópico, sino que se ha señalada como agente etiológico en algunos casos de leishmaniasis muco-

cutánea y, en especial, de leishmaniasis visceral atípica en humanos y caninos (45-49). En cuanto a los casos clínicos potencialmente asociados con *Le. amazonensis*, se esperaría una mayor incidencia en altitudes extremadamente altas o bajas, dado el alto porcentaje de positividad para *Lu. trapidoi* como vector primario.

Agradecimientos

A Orlando Chiluisa, Ernesto Villacrés y Katherine Pozo, estudiantes de Ciencias Biológicas y Ambiente de la UCE, por su colaboración en el trabajo de campo. A Franklin Vaca, por su apoyo técnico en campo. A Paúl Duque, por el diseño del mapa. A Gustavo Benaim y Graciela Uzcanga, del Instituto IDEA de Venezuela y la Universidad Internacional Sek de Ecuador, por facilitar la cepa de referencia MHOM/BZ/82/BEL21 de *Leishmania mexicana*.

Conflicto de intereses

No se declara ningún conflicto de intereses.

Financiación

El Centro de Investigación en Salud Pública y Zoonosis y el Instituto de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, recibieron financiación de la Fundación para la Asistencia Médica Internacional de Portugal. El Programa Prometeo-Senescyt de Ecuador otorgó apoyo a Jazmín Arrivillaga Henríquez y a Alon Warburg. Ana Poveda recibió financiación para el proyecto #21 de la Dirección General de Investigación y Posgrado, Universidad Central del Ecuador y de la *Academie de Recherche et d´Enseignement Supérieur* (ARES) de Bélgica.

Referencias

1. **Alexander JB, Takaoka H, Eshita Y, Gómez EA, Hashiguchi Y.** New records of phlebotomine sad flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. Mem Inst Oswaldo Cruz.1992;87:123-30. https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000100019
2. **LePont F, León R, Guerrini F, Gantier JC, Mouchet J, Echeverría R, *et al*.** Leishmaniasis in Ecuador. 3. *Lutzomyia trapidoi*, vector of *Leishmania panamensis*. Ann Soc Belg Med Trop. 1994;74:23-8.
3. **Jones LA, Cohnstaedt LW, Beati L, Terán R, León R, Munstermann LE.** New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. Proc Entomol Soc Wash. 2010;112:47-53. https://doi.org/10.4289/0013-8797-112.1.47
4. **Araújo P, Bersosa F, Carranco R, Granda V, Guerra P, Miranda N, *et al*.** Evaluación preliminar de la diversidad de escarabajos (Insecta: Coleoptera) del Chocó ecuatoriano. Revista Politécnica, Biología. 2005;26:120-40.
5. **Instituto Nacional de Estadística y Censos.** Estadística demográfica en el Ecuador. Quito: INEC; 2010. p. 300.
6. **Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y.** Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge -- a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:663-72. https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000700001
7. **Calvopiña M, Loor R, Lara F, Zambrano P, Hashiguchi Y.** Prevalencia y formas clínicas de las leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha, Ecuador. Rev Fac Cien Med Quito. 2012;37:31-8.
8. **Kato H, Uezato H, Gómez EA, Terayama Y, Calvopina M, Iwata H, *et al*.** Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:324-9.
9. **Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C.** Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. Biomédica. 2006;26:82-94. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1503
10. **Gómez EA, Kato H, Mimori T, Hashiguchi Y.** Distribution of *Lutzomyia ayacuchensis,* the vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis, at different altitudes on the Andean slope of Ecuador. Acta Trop. 2014;137:118-22. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.006
11. **Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, *et al.*** Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2005;72:87-93.
12. **Duque P, Vélez I, Morales M, Sierra D.** Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in afro-Colombian and Amerindian communities of Chocó Pacific Coast of Colombia. Neotrop Entomol. 2004;33:255-64. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000200018
13. **Gómez EA, Kato H, Hashiguchi Y.** Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. Acta Trop. 2014;140:41-9. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.003
14. **Young DG, Duncan M.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, Florida: Associated Publishers; 1994.
15. **Ministerio del Ambiente de Ecuador.** Línea base de deforestación del Ecuador Continental. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador; 2012. p. 1-32.
16. **Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID.** Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:645-7. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500010
17. **Rebollar-Téllez E, Ramírez-Fraire A, Andrade-Narváez FJ.** A two years study on vectors of cutaneous leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission cycle in the state of Campeche, México. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:555-60. https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000500004

18. **Rodrigues W, Medeiros J, Julião GR, Ríos-Velásquez CM, Marialvac EF, Desmouliérec S, *et al*.** Anthropic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. Acta Trop. 2014;139:44-52. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.017

19. **Plisco P, Fuentes-Castillo T.** Modelación de la distribución de especies y ecosistemas en el tiempo y en el espacio: una revisión de las nuevas herramientas y enfoques disponibles. Rev Geogr Norte Gd. 2011;48:61-79. https://doi.org/10.4067/S0718-34022011000100005

20. **Quintana MG, Salomón OD, De Grosso MS.** Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a primary forest-crop interface, Salta, Argentina. J Med Entomol. 2010;47:1003-10.

21. **Kato H, Gómez EA, Martini-Robles L, Muzzio J, Vélez L, Calvopiña M, *et al.*** Geographic distribution of *Leishmania* species in Ecuador based on the cytochrome B gene sequence analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004844. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004844

22. **El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, *et al*.** *Leishmania donovani*: Intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. Exp Parasitol. 2001;97:35-44. https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592

23. **Hijjawi N, Kanani KA, Rasheed M, Atoum M, Abdel-Dayem M, Irhimeh MR.** Molecular diagnosis and identification of *Leishmania* species in Jordan from saved dry samples. Biomed Res Int. 2016;2016:6871739. https://doi.org/10.1155/2016/6871739

24. **Freitas-Lidani KC, Messias-Reason IJ, Ishikawa EA.** A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:442-7. https://doi.org/10.1590/0074-0276130285

25. **Uzcanga G, Lara E, Gutiérrez, Beaty D, Beske T, Teran R, *et al.*** Nuclear DNA replication and repair in parasites of the genus *Leishmania* exploting differences to develop innovative therapeutic approaches. Crit Rev Microbiol. 2017;43:156-77. https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1188758

26. **Pommier Y.** Drugging topoisomerases: Lessons and challenges. ACS Chem Biol. 2013;8:82-95. https://doi.org/10.1021/cb300648v

27. **Villacís B, Carrillo D.** Estadística demográfica en el Ecuador: diagnóstico y propuesta. Quito: Instituto Nacional de Estadística y Censos; 2011. p. 1-74.

28. **Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología.** Anuario Meteorológico N° 52-2012. Quito: INMH; 2012. p. 132.

29. **Golczer G, Arrivillaga J.** Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: *Lutzomyia*). Rev Col Entomol. 2008;34:199-202.

30. **Echeverría-Fonseca G, Mera-Ruiz PA, Carrillo-Toro J, Rodríguez-Hidalgo R.** A new DNA extraction protocol for screwworm fly *Cochliomyia* species (Diptera: Calliphoridae). Front Environ Sci. 2015;2:68. https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00068

31. **Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R.** Clustal V improved software for multiple sequence alignment. Comp Appl Biosci. 1992;8:189-191.

32. **Saito N, Nei M.** The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol.1987;4:406-25. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

33. **Swofford DL.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Suderland, MA: Sinauer association Inc; 2001. http://benedick.rutgers.edu/software-manuals/PAUP4-manual.pdf

34. **Arrivillaga JC, Norris D, Feliciangeli MD, Lanzaro G.** Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. Infect Genet Evol. 2002;2:83-95. https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00087-4

35. **Arrivillaga J, Mutebi JP, Piñango H, Norris D, Alexander, B, Feliciangeli MD, *et al*.** The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. J Med Entomol. 2003;40:615-27.

36. **Logan-Klumpler FJ, De Silva N, Boehme U, Rogers MB, Velarde G, McQuillan J, *et al*.** GeneDB-an annotation database for pathogens. Nucl Acids Res. 2012;40:98-108. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1032

37. **Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS.** Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul state, Brazil. Acta Trop. 2010;115:126-30. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.013

38. **Figueroa-Roa L, Linhares A.** Synanthropy of Muscidae (Diptera) in the city of Valdivia, Chile. Neotrop Entomol. 2004;33:647-51. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000500016

39. **SPSS, INC.** Statistical Package for the Social Sciences. Version 15.0. Chicago, IL: SPSS; 2006.

40. **Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barret TV.** Characterization and classification of leishmanial parasite from humans, wild mammals, and sandflies in the Amazon region of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1981;44:645-61. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.645

41. **Ferreira AL, Sessa PA, Malta-Varejao JP, Falqueto A.** Distribution of sand flies (Diptera:Pshychodidae) at different altitudes in a endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:1061-7. https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000800006

42. **Armijos RX, Chico M, Cruz M, Guderian R, Kreutzer R, Berman J, *et al.*** Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador: Identification of parasites by enzyme electrophoresis. Am J Trop Med Hyg. 1990;42:424-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.424

43. **Bañuls AL, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, Guderian R, *et al*.** Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania brasiliensis* and *L. panamensi/guyanensis* in Ecuador. J Eukaryot Microbiol. 1997;44:408-11. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05716.x

44. **Hashiguchi Y, Gómez E, de Coronel VV, Mimori T, Kawabata M, Furuya M, *et al*.** Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major-like* parasites. Am J Trop Med Hyg. 1991;44:205-17. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.205

45. **Da Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA.** Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, State of Acre, Brazil. Trop Med Inter Health. 2006;11:1388-98. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01695.x

46. **Jennings Y, Almeida A.** Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania*. Parasite. 2014;21:1-11. https://doi.org/10.1051/parasite/2014039

47. **Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, *et al*.** Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100:79-82. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.025

48. **Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, *et al*.** The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba county, São Paulo state, Brazil. Vet Parasitol. 2007;149:280-4. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008

49. **Hoffmann AR, Navarro IT, Camargo VE Jr, Caldart ET, Breganó RM, Pereira PM.** *Leishmania amazonensis* in dog with clinical diagnosis of visceral leishmaniasis in Paraná state, Brazil - a case report. Semina: Ciências Agrárias. 2012;33:3265-70.

Biomédica 2017;37(Supl.2):98-105
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3553

ORIGINAL ARTICLE

Abundance, composition and natural infection of *Anopheles* mosquitoes from two malaria-endemic regions of Colombia

Carolina Montoya, Priscila Bascuñán, Julián Rodríguez-Zabala, Margarita M. Correa

Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introduction: In Colombia there are three *Anopheles* species implicated in malaria transmission as primary vectors; however, the local role of some *Anopheles* species must still be defined.
Objective: To determine the abundance, composition and natural infection rates for *Anopheles* mosquitoes with *Plasmodium* spp. in two malaria-endemic regions of Colombia.
Materials and methods: *Anopheles* mosquitoes were collected using the human-landing catches and while resting in livestock corrals in nine localities of two malaria-endemic regions of Colombia. Mosquitoes were morphologically identified and confirmed by PCR-RFLP-ITS2. Identified mosquitoes were processed and tested for *Plasmodium* parasite infection by ELISA and ssrRNA-based nested PCR.
Results: We collected 1,963 *Anopheles* mosquitoes corresponding to nine species. The most abundant species were *Anopheles nuneztovari* (53.5%) and *A. darlingi (*34.5%), followed by *A. triannulatus* s.l. *(*6%), and other species (≈5.9%). Three species were naturally infected with *Plasmodium* spp.: *A. darlingi*, *A. nuneztovari* and *A. triannulatus* s.l.
Conclusions: Natural infection of *A. darlingi* and *A. nuneztovari* indicate that these malaria vectors continue to be effective carriers of *Plasmodium* in the localities under study in Valle del Cauca and Chocó. Additionally, the infected *A. triannulatus* s.l. collected in livestock corrals in the locality of the department of Córdoba suggests the need for further studies to define the epidemiological importance of this species given its abundance and opportunistic anthropophilic behavior.

Key words: *Anopheles*; *Plasmodium*; malaria; infection; disease vectors; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3553

Abundancia, composición e infección natural de mosquitos *Anopheles* en dos regiones endémicas para malaria en Colombia

Introducción. En Colombia hay tres especies de mosquitos *Anopheles* implicadas como vectores primarios en la transmisión de la malaria o paludismo; sin embargo, el rol local de algunas especies de *Anopheles* aún debe determinarse.
Objetivo. Determinar la abundancia, la composición y la infección natural de mosquitos anofelinos con *Plasmodium* spp. en dos regiones endémicas de malaria en Colombia.
Materiales y métodos. Se recolectaron mosquitos del género *Anopheles* usando los métodos de recolección con cebo humano y en reposo en corrales de ganado vacuno, en nueve localidades de dos regiones endémicas para malaria en Colombia. Los especímenes se identificaron morfológicamente y se confirmaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) en el espaciador intergénico ribosómico nuclear 2 (*Internal Transcribed Spacer*, ITS-2) (PCR-RFLP-ITS2). Los especímenes se procesaron y analizaron mediante ELISA y PCR anidada basada en la subunidad pequeña del ARN ribosómico (*small subunit ribosomal RNA*, ssrRNA) para determinar la infección por *Plasmodium*.
Resultados. Se recolectaron 1.963 mosquitos *Anopheles* correspondientes a nueve especies. *Anopheles nuneztovari* fue la especie predominante (53,5 %), seguida por *A. darlingi* (34,5 %), *A. triannulatus* s.l. (6 %) y por otras especies (≈5,9 %). Tres especies se encontraron naturalmente infectadas con *Plasmodium* spp.: *A. darlingi*, *A. nuneztovari* y *A. triannulatus* s.l.
Conclusiones. La infección natural de *A. darlingi* y *A. nuneztovari* indica que estos vectores primarios siguen siendo actores principales en la transmisión de malaria en las localidades estudiadas de los departamentos del Valle del Cauca y Chocó. Además, el espécimen *A. triannulatus* s.l. infectado,

Author's contributions:
Carolina Montoya and Julián Rodriguez-Zabala processed the samples.
Margarita M. Correa designed the study.
All authors participated in the analysis and interpretation of the data, and the writing of the paper.

recolectado en corrales de animales de la localidad estudiada en el departamento de Córdoba, indica que existe la necesidad de estudios futuros para establecer la importancia epidemiológica de esta especie dada su abundancia y comportamiento antropofílico oportunista.

Palabras clave: *Anopheles*; *Plasmodium*; malaria, paludismo; infección; vectores de enfermedades; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3553

Malaria continues to be an important world public health problem with an estimate of 438,000 deaths registered during 2015 in tropical and subtropical regions where climate conditions are appropriate for the development of the malaria parasite and its mosquito vector (1).

In Colombia, more than 50,000 new cases were confirmed for malaria in 2015, with approximately 78% of the cases occurring in the departments of Chocó and Nariño, in the Pacific Coast (PAC), and in Antioquia and Córdoba, in the Urabá Bajo-Cauca and Alto-Sinú (UCS) regions (2). All cases were caused by *Plasmodium falciparum* (51.8%) and *Plasmodium vivax* (46.6%), while a small percentage corresponded to mixed malaria (1.6%) (2).

Moreover, the country harbors approximately 47 *Anopheles* species reported until now (3,4); based on entomological and epidemiological data, three of them have been recognized as primary malaria vectors: *Anopheles albimanu*s, *A. darlingi* and *A. nuneztovari* (3,5-7). Other species have been incriminated as secondary or local vectors, among them, *A. pseudopunctipennis*, *A. punctimacula*, *A. neivai*, *A. rangeli*, *A. oswaldoi* (8,9). Likewise, recent studies carried out in some malaria-endemic regions of Colombia have shown additional *Anopheles* species naturally infected with *Plasmodium* spp., such as *A. benarrochi* B, which was found infected with the two strains of *P. vivax* (8); *A. triannulatus* s.l. and *A. calderoni* with *P. vivax* and *P. falciparum* (9-12), suggesting a possible role of these anopheline mosquitoes in the transmission of the malaria parasite.

However, the implication of these species as malaria vectors is not yet well understood in Colombia, and more evidence is needed to incriminate them in transmission. In addition, permanent changes in environmental and climatic conditions in malaria endemic areas (6,12) highlight the importance of frequently monitoring parameters such as abundance, composition and natural infection of the *Anopheles* species, which would contribute to improving local vector control strategies.

The aim of this study was to determine the abundance, composition and natural infection rates with *Plasmodium* spp. of *Anopheles* mosquitoes in two malaria-endemic regions of Colombia.

Materials and methods

Study area

Anopheles mosquitoes were collected in nine locations of five municipalities in the Urabá Bajo-Cauca Alto-Sinú (UCS) and Pacific (PAC) regions of Colombia, selected for being endemic for malaria: Tuis Tuis in Tierralta (TA), municipality located in the south of the department of Córdoba, in the Alto Sinú subregion, and characterized by its humid tropical forest (13); El Rayo and Santa Clara, Tarazá (TAZ), located in the northwest of the department of Antioquia in the Bajo Cauca subregion, characterized by dry tropical forest (13); in the PAC region, characterized by humid tropical forest (14), we sampled El Arenal and Doña Josefa municipalities in Atrato (ATR) and San Francisco de Tauchigadó and Puné in Medio Atrato (MAT), Chocó, as well as Córdoba and Zacarías in Buenaventura (BUE), department of Valle del Cauca (figure 1). Localities were selected based on official reports of malaria cases and the geographic distribution of malaria vectors (15,16).

Mosquito collection and sample processing

Female adult mosquitoes were collected in March and May, 2015, during three days per location, except in Tuis Tuis where we sampled for four days, during six hours daily (18:00-24:00 h). Mosquitoes were captured using human-landing catches (HLC) and while resting in livestock corrals (LC) when available.

Informed consent forms were signed using the protocol for collection procedures approved by the Institutional Review Board of Antioquia University as stated in Minutes 063 of the *Comité de Bioética de la Facultad Nacional de Salud Pública*.

Corresponding author:
Margarita M. Correa, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 8489
margaritcorrea@gmail.com y mmaria.correa@udea.edu.co

Received: 08/08/16; accepted: 11/07/17

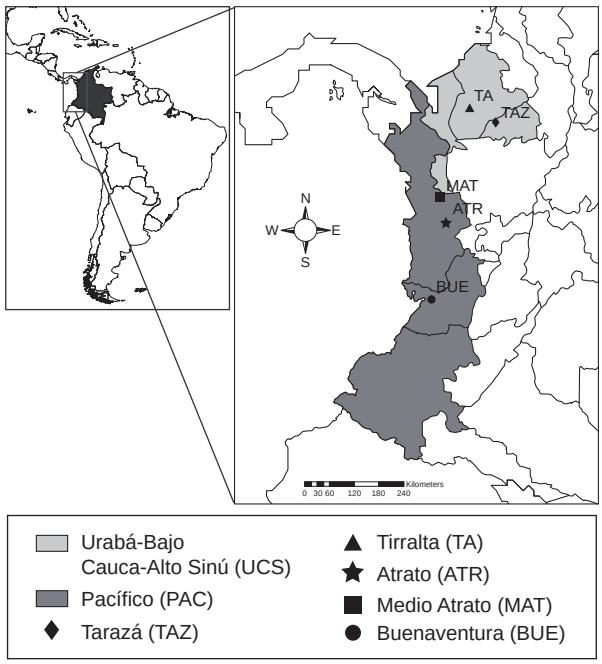


Figure 1. Collection sites. Adult mosquitoes were collected in nine localities of five municipalities of two endemic regions of Colombia: Tarazá (TAZ), department of Antioquia; Tierralta (TA), department of Córdoba; Medio Atrato (MAT) and Atrato (ATR), department of Chocó, and Buenaventura (BUE), department of Valle del Cauca.

Anopheles species identification and preservation

Collected mosquitoes were identified by morphological features using existing taxonomy keys (3). All the specimens that were difficult to identify morphologically, either because specimens were damaged during collection or because they are part of species complexes or sibling species, as well as less represented species, were confirmed by a PCR-RFLP assay based on the ITS2 sequences (17,18).

Following identification, heads and thoraces were preserved in silica gel for further testing with ELISA; abdomens were stored in 95% ethanol for DNA extraction and ssrRNA nested PCR. A wing and posterior leg of 5% of the total adult specimens of each identified species were mounted on glass slides for morphological backup.

Plasmodium detection by ELISA

We conducted an enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) for *Plasmodium* detection following standardized protocols (15,16). Monoclonal antibodies (MAb) were provided by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta) (19-22). The ELISA was conducted using species-specific MAbs in separate plates to detect circumsporozoite (CSP) protein specific for either *P. falciparum* or *P. vivax* (VK210 or VK247 variants). Male *Anopheles* lysates served as negative controls. In order to detect malaria parasite infection, a preliminary screening test with five heads and thoraces of the same *Anopheles* species were pooled together and tested in single wells (6,16). Positive pools were confirmed by a second ELISA test in order to reduce chances of reporting false positives.

Plasmodium detection by nested PCR

A nested PCR was performed to detect infected *Anopheles* mosquitoes and to confirm ELISA results. Genus-specific primers designed to amplify the small ribosomal DNA subunit (ssrRNA) gene of *Plasmodium* were used following a previously described protocol (23). DNA from individual abdomens was obtained following a DNA extraction based on salt precipitation procedures as previously described (24); 4 µl of extracted DNA were used as template in a 25 µl reaction mix for both first and second amplifications of the nested PCR. *Plasmodium vivax* DNA served as positive control. Finally, PCR products were analyzed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide and photodocumented (ChemiDoc-It 2 Imager System®, UVP, LLC, Upland, CA).

Data analysis

The species abundance was calculated considering the total number of mosquitoes collected in each municipality expressed in percentages. Mosquito infection rates (IR) or the percentage of *Plasmodium*-infected *Anopheles* were assessed by the number of positive *Anopheles* specimens of a given species (np) out of the total analyzed by municipality (nt) by 100 [IR = (np/nt) × 100]. Mosquito species mean density, performed for *Anopheles* species with more than five specimens per locality, was calculated as the geometric mean of the number of mosquitoes captured per person each night. In the case of the collections of resting specimens in livestock corrals, the mean density was expressed as the geometric mean of the number of mosquitoes captured per corral per night.

Results

Anopheles species composition and abundance

A total of 1,963 female *Anopheles* mosquitoes were collected in nine locations from five municipalities in two malaria-endemic regions of Colombia (figure

1). We collected 155 mosquitoes in TAZ, 287 in TA, 500 in MAT, 242 in ATR and 779 in BUE (table 1). *Anopheles nuneztovari* was the most abundant species with 53.5% of the total collected specimens, followed by *A. darlingi* with 34.5%, *A. triannulatus* s.l. with 6%,*A. albitarsis* s l. with 4%, and *A. pseudopunctipennis* with 1.4%; other species such as *A. albimanus, A. apicimacula, A. punctimacula* and *A. calderoni* were present in low frequencies and together accounted for 0.5% (table 2) of the total.

As regards species composition according to location (table 1), *A. nuneztovari* was the most abundant species collected in the location of Tuis Tuis (TA), with 62.3% and a mean density of 2.3 mosquitoes/person/night, followed by *A. triannulatus* s.l. (15.3%, 0.3 resting mosquitoes/livestock corral/night) and *A. darlingi* (13.2%, 0.4 mosquitoes/person/night). Other species were present in lower frequencies, including *A. pseudopunctipennis* (8.7%) and *A. albimanus* (0.3%).

In the locality of El Rayo (TAZ), the predominant species were *A. albitarsis*s l. with 64.2% and a mean density of 0.4 mosquitoes/person/night and 1.3 resting mosquitoes/livestock corral/night, and *A. triannulatus* s.l. with 35.8% and a mean density of 0.3 mosquitoes/person/night, and 0.8 resting mosquitoes/livestock corral/night. In the locality of Santa Clara (TAZ), the predominant species were *A. triannulatus* s.l. (58.3%, 0.4 mosquitoes/person/night) and *A. nuneztovari* (16.7%); other species such as *A. pseudopunctipennis, A. albimanus, A. apicimacula* were present in lower frequencies.

Table 1. Data on abundance, composition and natural *Plasmodium* infection in *Anopheles* mosquitoes

Department (Municipality) Locality/Coordinates	Collection date (Number of days)	Species	n (%)	Mean density*/ recollection method	*Plasmodium* species (IR)
Córdoba (Tierralta)	March, 2015 (4)	*A. nuneztovari*	179 (62.3)	2.3 HLC	
Tuis Tuis		*A. triannulatus* s.l.	44 (15.3)	0.3 LC	*Plasmodium*
8°2'34.9''N, 76°5'23.9''W		*A. darlingi*	38 (13.2)	0.4 HLC	spp.[a] (2.2%)
		A. pseudopunctipennis	25 (8.7)	0.4 HLC	
		A. albimanus	1 (0.3)		
Antioquia (Tarazá)	March, 2015 (3)	*A. albitarsis* s.l.	84 (64.2)	0.4 HLC	-
El Rayo				1.3 LC	-
7°32'20.5''N, 75°21'59.1''W		*A. triannulatus* s.l.	47 (35.8)	0.3 HLC	
				0.8 LC	
Santa Clara	March, 2015 (3)	*A. triannulatus* s.l.	14 (58.3)	0.4 HLC	-
7°42'49.7''N, 75°30'45.2''W		*A. nuneztovari*	4 (16.6)		-
		A. pseudopunctipennis	3 (12.5)		-
		A. albimanus	2 (8.3)		-
		A. apicimacula	1 (4.1)		-
Chocó (Atrato)	March, 2015 (3)	*A. darlingi*	75 (50.6)	1.5 HLC	*P. falciparum* [a,b]
Arenal		*A. nuneztovari*	72 (48.6)	1.4 HLC	(1.3%)
5°31'45.1''N, 76°36'57.9''W		*A. calderoni*	1 (0.7)		HLC/Outdoors
		A. darlingi	77 (81.9)	1.7 HLC	-
Doña Josefa	March, 2015 (3)	*A. nuneztovari*	14 (14.8)	0.2 HLC	-
5°33'8.2''N, 76°38'45.8''W		*A. apicimacula*	3 (3.1)		-
Chocó (Medio Atrato)	March, 2015 (3)	*A. darlingi*	341(99.1)	6.9 HLC	
San Francisco de Tauchigadó		*A. triannulatus* s.l.	2 (0.6)		
6°5'20''N, 76°43'42.2'W		*A. punctimacula*	1 (0.3)		
Puné	March, 2015 (3)	*A. darlingi*	147 (94.2)	3.4 HLC	-
5°57'57.7''N, 76°43'39''W		*A. triannulatus* s.l.	6 (3.8)		-
		A. nuneztovari	3 (1.9)		-
Valle del Cauca (Buenaventura)	May, 2015 (3)	*A. nuneztovari*	715 (100)	14.2 HLC	*Plasmodium*
Córdoba					spp.[a] (0.13%)
3°58'12.2''N, 76°55'47''W					HLC/Outdoors
Zacarías	May, 2015 (3)	*A. nuneztovari*	64 (100)	1.7 HLC	-
3°49'2.3''N, 76°59'43.9''W					

IR: Infection rate (number of positive specimens/number of total specimens analyzed) × 100
LC: Resting in livestock corrals; HLC: Human-landing catches
[a] *Plasmodium* detection by nested PCR
[b] *Plasmodium* detection by ELISA
* Mean density: Geometric mean of the number of mosquitoes/person/night or resting mosquitoes/livestock corral/night, calculated for *Anopheles* species with >5 specimens per locality

In the location of El Arenal (ATR) the most frequent species was *A. darlingi* with 50.6% and a mean density of 1.5 mosquitoes/person/night, followed by *A. nuneztovari* (48.6%, 1.4 mosquitoes/person/night) and *A. calderoni* (0.7%).

Similarly, in the location of Doña Josefa (ATR) the most frequent species were *A. darlingi* (81.9%) and *A. nuneztovari* (14.8%), with a mean density of 1.7 mosquitoes/person/night and 0.2 mosquitoes/person/night, respectively, followed by *A. apicimacula* with 3.1%. In the location of San Francisco de Tauchigadó (MAT), the predominant species was *A. darlingi* with 99.1% and 6.9 mosquitoes/person/night; A. *triannulatus* s.l. and *A. nuneztovari* together represented 0.9%.

Likewise, in the location of Puné (MAT) *A. darlingi* (94.2%, 3.4 mosquitoes/person/night) was the predominant species, while *A. triannulatus* s.l. (3.8%) and *A. nuneztovari* (1.9%) were found in low abundances.

Finally, in the two locations of BUE, Córdoba and Zacarías, *A. nuneztovari* was found as the only species (100%), with a mean density of 14.2 mosquitoes/person/night and 1.7 mosquitoes/person/night, respectively.

In general, the two main Colombian vectors, *A. darlingi* and *A. nuneztovari,* were present in most locations of the two regions (PAC and UCS). However, species such as *A. albitarsis* s.l. and *A. pseudopunctipennis* were only detected in UCS and *A. punctimacula* and *A. calderoni* in PAC.

Biting preference

There were differences in the biting preference of the most abundant species determined by the collection method (HLC or LC) (figure 2). *Anopheles nuneztovari* and *A. darlingi* mosquitoes were mainly collected by HLC (99.7% and 99.8%, respectively). *A. triannulatus* s.l. was mostly captured in LC (66.6%), while the remaining 33.3% were collected by HLC.

Table 2. Total *Anopheles* species abundance in the five municipalities of collection

***Anopheles* species**	**Municipality**	**Species abundance %**	**Number of specimens identified by morphology**	**Number of specimens molecularly confirmed***
A. nuneztovari	Tarazá,Tierralta, Atrato, Medio Atrato, Buenaventura	53.5	1051	113
A. darling	Tarazá, Atrato, Medio Atrato	34.5	677	34
A. triannulatus s.l.	Tarazá, Tierralta, Medio Atrato	6	119	9
*A. albitarsis*s.l.	Tarazá	4	79	27
A. pseudopunctipennis	Tarazá, Tierralta	1.4	28	2
A. albimanus	Tarazá, Tierralta	0.1	3	2
A. apicimacula	Atrato	0.1	3	1
A. calderoni	Atrato,Tarazá	0.1	2	-
A. punctimacula	Medio Atrato	<0.01	1	1

* By PCR-RFLP-ITS2

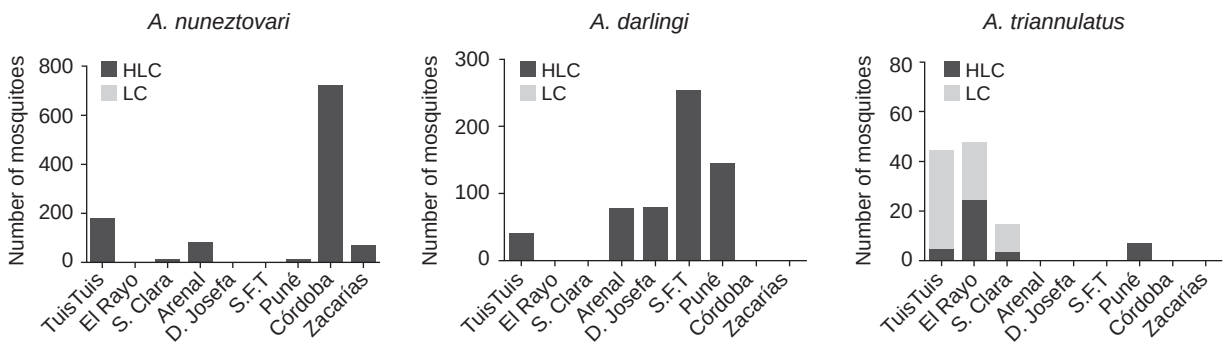


Figure 2. Biting preference of the three most abundant species. Mosquitoes were collected in nine localities of five municipalities of two malaria endemic regions of Colombia. Córdoba: Tuis Tuis; Antioquia: El Rayo and S. Clara (Santa Clara); Chocó: Arenal (El Arenal), D. Josefa (Doña Josefa), S.F.T (San Francisco de Taunchigadó) and Puné; Valle del Cauca: Córdoba and Zacarías. Bars represent the number of mosquitoes collected either by human-landing catches (HLC) or in livestock corrals (LC), showing human or animal biting preference, respectively.

Detection of natural Plasmodium infection in Anopheles spp.

In order to assess the natural infection rates of *Anopheles* mosquitoes with *Plasmodium* spp.in the nine municipalities under study, 1,914 specimens were first analyzed by ELISA. This allowed for the detection of one *A. darlingi* mosquito infected with *P. falciparum* in El Arenal (ATR). The result was confirmed by a second ELISA and a nested PCR, which were both positive. An infection rate (IR) of 1.3% was calculated for this species when comparing with the total amount of *A. darlingi* specimens analyzed in ATR. Furthermore, 1,142 specimens were examined by nested PCR in order to detect infection with *Plasmodium* spp., which allowed for the detection of two additional positive samples: one *A. triannulatus* s.l. specimen collected in the location of Tuis Tuis (TA), with an IR of 2.2% for this location, and the second, an *A. nuneztovari* specimen collected in the location of Córdoba (BUE), representing an IR of 0.13%.

Discussion

Abundance and the preference to bite humans are among the characteristics that define a mosquito species as an effective human vector (25). However, species composition and frequencies vary among sampling sites and seasons, rendering constant monitoring of these parameters essential (7,12). In this study we analyzed species abundance and composition, biting preferences and natural infection with *Plasmodium* of *Anopheles* mosquitoes from nine locations of two malaria-endemic regions of Colombia. Results showed a predominance of *A. nuneztovari* mosquitoes (53.5%), followed by *A. darlingi* (34.5%), known as the main malaria vectors in the country (5-7,16). In seven of the nine locations sampled during March and May, 2015, *A. nuneztovari* mosquitoes were present except in El Rayo-TAZ (Antioquia) and San Francisco de Tauchigadó-MAT (Chocó). Similarly, other studies have found *A. nuneztovari* in some locations of Antioquia and Chocó (6,7,11,16,26). Interestingly, the last report of *A. nuneztovari* in Chocó dates from 2004 (26), which evidences the importance of continuously listing malaria vectors present in the different regions of Colombia and keeping updated information for vector control strategies. In addition, these two species showed a high preference to bite humans in most of the sampled locations, with very few specimens collected in livestock corrals (figure 2). Besides, the natural infection of *A. nuneztovari* and *A. darlingi* with the *Plasmodium* parasite, together with the data showing that both species presented the highest mean mosquito densities (up to 14.2 mosquitoes/person/night and 6.9 mosquitoes/person/night, respectively), are two important results that reinforce reports on their highly anthropophilic feeding habits and their role as primary malaria vectors (5-7,16).

It is worth noting that three *A. albimanus* specimens were collected in TA, Córdoba and TAZ, Antioquia, which are two non-coastal locations. These low frequencies were expected given the ecological characteristics of the locations sampled, as *A. albimanus* is predominantly found at lower altitudes and on coastal areas, preferring slightly brackish larval habitats (5,15). However, some authors have shown the presence of *A. albimanus* in higher altitudes and non-costal localities (27,28), which suggests adaptability of this species to other ecosystems. Although no *Plasmodium*-infected *A. albimanus* was found in this study, this vector might be contributing to the malaria epidemiology in these locations. Therefore, the need to understand the role of this species in higher and non-coastal regions demand more studies to continue monitoring *A. albimanus* in these areas.

Moreover, in this study no *A. albimanus* specimens were found in the location of Zacarías where other studies had previously reported this species (29). This might be a consequence of the temporal differences between both studies and even of differences in collection seasonality, as the cited study sampled mosquitoes between August and September, 1993, and December and January, 1994, while mosquitoes in our study were collected in May, 2015.

Furthermore, *A. triannulatus* s.l. was the third most abundant species in this inventory; it was found in the department of Antioquia, as formerly documented (6,16), and it was the predominant species in the location of Santa Clara (TAZ). Likewise, *A. triannulatus* s.l. abundance in the municipality of Tierralta, Córdoba, was marginally higher than the abundance reported for *A. darlingi*. This result agrees with a previous study conducted in 2008-2009, where *A. triannulatus* s.l. was the second most abundant species in the same municipality, but in a different location (6), and a study in the department of Córdoba where *A. triannulatus* s.l. and *A. nuneztovari* larvae were predominant (30). Additionally, most of the specimens were collected in livestock corrals (figure 2), which suggests a zoophilic biting preference, as formerly reported (5).

The abundance of this species might be influenced by livestock production, one of the main economic activities in this department (6). However, one third (33.3%, figure 2) of the specimens were collected by HLC. Moreover, a *Plasmodium*-infected specimen was collected in Tierralta, Córdoba, as previously reported for another location of this municipality (31).

These results indicate that *A. triannulatus* s.l. might be contributing to malaria transmission in regions where this species is present (6,11,12). However, as the infected specimen on this study was recollected in livestock corrals and the *Plasmodium* spp. infection was only PCR-detected in the midgut of the mosquito, no transmission to humans can be inferred from this data as formerly discussed by other authors (11). Consequently, no incrimination should be stated until this is complemented with epidemiological data.

Other species such as *A. albitarsis* s.l., *A. pseudopunctipennis, A. apicimacula, A. punctimacula* and *A. calderoni* were present in either one or two of the nine locations sampled (table 2). *Anopheles albitarsis* s.l. was the predominant species in the location of El Rayo in TAZ (Antioquia), where no specimens of the species *A. nuneztovari* and *A. darlingi* were present, which is interesting since *A. albitarsis* s.l. is usually detected in low numbers (6).

Overall, these results indicate that the *Anopheles* species composition in Antioquia, Córdoba, Chocó and Valle del Cauca remain relatively stable with *A. nuneztovari* and *A. darlingi* being the most predominant species and sharing their niche with other *Anopheles* species. Nonetheless, the important presence of *A. triannulatus* s.l. in the northwestern locations, presenting an opportunistic antropophilic behavior and detected with natural infection, suggests the relevance of conducting further studies to determine its importance in human malaria transmission.

Acknowledgements

We are grateful to all the members of the *Grupo de Microbiología Molecular* of *Universidad de Antioquia* for their assistance in the field and in the laboratory.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Funding

This work was carried out in the framework of a project funded by the *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación* (Colciencias), No. 596-2013, granted to MMC. Support was also received from *Estrategia para la Sostenibilidad de Grupos de Investigación, Universidad de Antioquia* 2016-2017, No. ES84160123. PB is a postdoctoral fellow of Colciencias with a grant from *Es tiempo de volver* 2014 program, code 2015-8423. CM received funding from Colciencias through a grant from the *Joven Investigador* 2014 program.

References

1. **World Health Organization.** World Malaria Report. Geneva: WHO; 2015. Accessed: June 25, 2016. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf
2. **Instituto Nacional de Salud.** Comportamiento de los eventos de vigilancia en salud pública. Enfermedades transmitidas por vectores. Malaria. Semana epidemiológica número 52 de 2015 (27 dic. - 02 ene.). Boletín Epidemiológico Semanal. 2015;52. Accessed: March 3, 2017. Available from: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf
3. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Segunda edición. Cali: Universidad del Valle; 2009. p. 260.
4. **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, *et al.*** Malaria vector species in Colombia - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(Suppl.1):223-38. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028
5. **Olano VA, Brochero HL, Sáenz R, Quiñones ML, Molina JA.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica. 2001;21:402-8.
6. **Naranjo-Díaz N, Rosero D, Rua-Uribe G, Luckhart S, Correa M.** Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. Parasit Vectors. 2013;6:61. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-61
7. **Naranjo-Díaz N, Altamiranda M, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. PLoS One. 2014;9:e103769. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103769
8. **Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton Y.** 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. https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000600007
9. **Gómez GF, Bickersmith SA, González R, Conn JE, Correa MM.** Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the Neotropical Arribalzagia series. PLoS One. 2015;10:e0119488. https://doi.org/:10.1371/journal.pone.0119488
10. **Orjuela LI, Herrera M, Erazo H, Quiñones ML.** Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con *Plasmodium*. Biomédica. 2013;33:42-52. https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i1.619
11. **Rosero DA, Naranjo-Díaz N, Álvarez N, Cienfuegos AV, Torres C, Luckhart S, *et al.*** Colombian *Anopheles*

triannulatus (Diptera: Culicidae) naturally infected with *Plasmodium* spp. ISRN Parasitol. 2013;2013:927453. https://doi.org/10.5402/2013/927453

12. **Orjuela LI, Ahumada ML, Ávila I, Herrera S, Beier JC, Quiñones ML.** Human biting activity, spatial-temporal distribution and malaria vector role of *Anopheles calderoni* in the southwest of Colombia. Malar J. 2015;14:256. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0764-6

13. **Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** Atlas de Colombia. Quinta edición. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2002. p. 342.

14. **Morrone JJ.** Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. Annu Rev Entomol. 2006;51:467-94. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130447

15. **Gutiérrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, *et al*.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. Acta Trop. 2008;107:99-105. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.019

16. **Gutiérrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, *et al.*** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1117-24. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800008

17. **Zapata MA, Cienfuegos AV, Quirós OI, Quiñones ML, Luckhart S, Correa MM.** Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of ITS sequences. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:67-72. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.67

18. **Cienfuegos AV, Gómez GF, Córdoba LA, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** 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. Rev Biomed. 2008;19:35-44.

19. **Wirtz RA, Burkot TR, Graves PM, Andre RG.** Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. J Med Entomol.1987;24:433-7.

20. **Wirtz RA, Charoenvit Y, Burkot TR, Esser KM, Beaudoin RL, *et al.*** Evaluation of monoclonal antibodies against *Plasmodium vivax* sporozoites for ELISA development. Med Vet Entomol. 1991;5:17-22. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1991.tb00515.x

21. **Wirtz RA, Sattabongkot J, Hall T, Burkot TR, Rosenberg R.** Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Plasmodium vivax*-VK247 sporozoites. J Med Entomol. 1992;29:854-7.

22. **Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, *et al.*** Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. Bull World Health Organ. 1987;65:39-45.

23. **Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA.** A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:687-92.

24. **Rosero DA, Gutiérrez LA, Cienfuegos AV, Jaramillo LM, Correa MM.** Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. Rev Colomb Entomol. 2010;36:260-3.

25. **Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D.** Evolutionary forces on *Anopheles*: What makes a malaria vector? Trends Parasitol. 2010;26:130-6. https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.12.001

26. **Sierra DM, Vélez ID, Linton YM.** Malaria vector *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* comprises one genetic species in Colombia based on homogeneity of nuclear ITS2 rDNA. J Med Entomol. 2004;41:302-7. https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.302

27. **González R, Martínez LM.** Nuevo registro de distribución altitudinal de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). Boletín del Museo de Entomología. 2006;7:19-23.

28. **Pinault LL, Hunter FF.** New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. Malar J. 2011;10:236. https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-236.

29. **Olano VA, Carrasquilla G, Méndez F.** Transmisión de malaria urbana en Buenaventura, Colombia: aspectos entomológicos. Pan Am. Public Health. 1997;1:287-94. https://doi.org/10.1590/S1020-49891997000400005

30. **Conde M, Pareja P, Orjuela L, Ahumada M, Durán S, Jara JA, *et al*.** Larval habitat characteristics of the main malaria vectors in the most endemic regions of Colombia: Potential implications for larval control. Malar J. 2015;14:476. https://doi.org/10.1186/s12936-015-1002-y

31. **Aycardi-Morinelli MP, Correa-Ochoa MM, Zárate-Peñata EdC, Padrón-Echenique C.** Determinación de especies anofelinas en una localidad endémica de malaria en el departamento de Córdoba, noroeste de Colombia. Entomotropica. 2016;31:294-301.

Biomédica 2017;37(Supl.2):106-23
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3496

ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis espacio-temporal de las condiciones biofísicas y ecológicas de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en la region nororiental de los Andes de Colombia

Jaime Badel-Mogollón[1,2], Laura Rodríguez-Figueroa[2], Gabriel Parra-Henao[1,3]

[1] Red Chagas Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Skandha EIT SAS, Medellín, Colombia
[3] Grupo de Epidemiología y Bioestadística, Universidad CES, Medellín, Colombia

Introducción. Ante el desconocimiento del contexto espacio-temporal de las condiciones biofísicas (hidrometereológicas y de densidad de la cobertura vegetal) de las zonas con presencia de*Triatoma dimidiata* en Santander y Boyacá, es necesario dilucidar los patrones asociados con estas variables para determinar su distribución y control.
Objetivo. Hacer el análisis espacio-temporal de las variables biofísicas relacionadas con la distribución de *Triatoma dimidiata* de los departamentos de Santander y Boyacá en la región nororiental de Colombia.
Materiales y métodos. Se utilizaron las bases de datos de los registros de presencia de*T. dimidiata* y de factores hidrometereológicos del *Special Report on Emissions Scenarios* (SRES) del *Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC. Se estudiaron las variables de temperatura, humedad relativa, pluviosidad y densidad de la cobertura vegetal a nivel regional y local, se hizo el análisis espacial y el geoestadístico, así como el análisis estadístico descriptivo y temporal de las series de Fourier.
Resultados. En las áreas con mayor presencia de *T. dimidiata*, las temperaturas a dos metros del suelo y en suelo cubierto oscilaron entre 14,5 y 18,8 °C, y la temperatura ambiente fue de 30 a 32 °C. La densidad de la cobertura vegetal y la pluviosidad en las áreas de mayor presencia de *T. dimidiata* exhibieron patrones de picos anuales y bienales. Los valores de la humedad relativa fluctuaron entre 66,8 y 85,1 %.
Conclusiones. Las temperaturas a nivel de superficie y a dos metros del suelo fueron las variables determinantes de la distribución espacio-temporal de *T. dimidiata*. La elevada humedad relativa incentivó la búsqueda de refugios e incrementó la distribución geográfica en los picos anual y bienal de pluviosidad a nivel regional. Las condiciones ecológicas y antrópicas sugieren que *T. dimidiata* es una especie de gran resiliencia.

Palabras clave: Triatominae; enfermedad de Chagas; ecología; clima; análisis espacial; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3496

Spatio-temporal analysis of the biophysical and ecological conditions of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the northeast region of Colombia

Introduction: Due to the lack of information regarding biophysical and spatio-temporal conditions (hydrometheorologic and vegetal coverage density) in areas with *Triatoma dimidiata* in the Colombian departments of Santander and Boyacá, there is a need to elucidate the association patterns of these variables to determine the distribution and control of this species.
Objective: To make a spatio-temporal analysis of biophysical variables related to the distribution of *T. dimidiate* observed in the northeast region of Colombia.
Materials and methods: We used the Intergovernmental Panel on Climate Change Special Report on Emissions Scenarios (IPCC SRES) data bases registering vector presence and hydrometheorologic data. We studied the variables of environmental temperature, relative humidity, rainfall and vegetal coverage density at regional and local levels, and we conducted spatial geostatistic, descriptive statistical and Fourier temporal series analyses.
Results: Temperatures two meters above the ground and on covered surface ranged from 14,5°C to 18,8°C in the areas with the higher density of *T. dimidiata*. The environmental temperature fluctuated between 30 and 32°C. Vegetal coverage density and rainfall showed patterns of annual and biannual peaks. Relative humidity values fluctuated from 66,8 to 85,1%.

Contribución de los autores:
Jaime Badel: análisis de bases de datos, análisis geoestadístico y estadístico y escritura del manuscrito
Laura Rodríguez: análisis de bases de datos y análisis de Fourier
Gabriel Parra-Henao: formulación del proyecto de investigación, desarrollo de los muestreos de campo, procesamiento del material entomológico, análisis y escritura del manuscrito

Conclusions: Surface temperature and soil coverage were the variables that better explained the life cycle of *T. dimidiata* in the area. High relative humidity promoted the seek of shelters and an increase of the geographic distribution in the annual and biannual peaks of regional rainfall. The ecologic and anthropic conditions suggest that *T. dimidiata* is a highly resilient species.

Key words: Triatominae; Chagas disease; ecology; climate; spatial analysis; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3496

En Colombia, varias especies de triatominos son vectores de*Trypanosoma cruzi* (1,2), entre ellos, *Triatoma dimidiata* (3). Esta especie, originaria del suroriente de México y nororiente de Guatemala (4), se extiende desde México hasta Ecuador y el noreste de Perú (5). Se sabe que *T. dimidiata* tiene una gran variabilidad intraespecífica (3,6-10) y que ocupa ambientes tanto selváticos como domésticos y peridomésticos (3,5,7,8).

Esta especie, típica de hábitats terrestres (11), se adapta a diferentes ecótopos (cuevas, rocas, oquedades, nidos de vertebrados, etc.) en el ambiente selvático (8,11-14), incluidas las palmas de la especie *Attalea butyracea* en el Caribe colombiano y en la Sierra Nevada de Santa Marta (15). Además, es una especie capaz de sobrevivir en diferentes rangos altitudinales (12), con la consecuente capacidad de invasión y dispersión espacial y estacional (8). Su domiciliación se ve favorecida por las condiciones ambientales (2), principalmente en la región centro-oriental del país, en los departamentos de Boyacá y Santander (12,16). Sin embargo, es poco lo que se sabe sobre las condiciones biofísicas que favorecen su proliferación (12,17).

Además del estudio de su biología y ecoepidemiología, la distribución geográfica de otras especies de triatominos (por ejemplo, *T. infestans*, *T. patagonica*, *T. platensis* y *Rhodnius* spp.), se ha relacionado con variables biofísicas como la temperatura, la humedad, la precipitación y la elevacion (18). En este sentido, se ha demostrado que, en la península de Yucatán, *T. dimidiata* es más abundante en los domicilios y que la tasa de infección por *T. cruzi* es mayor en la época de calor entre abril y junio (19).

Asimismo, se ha comprobado que los vectores del género *Triatoma* localizados en zonas geográficas con altas temperaturas pueden tener más generaciones por año (18) que los de las zonas más templadas (20), y que la mayor diversidad de especies de triatominos se localiza en biomas con estaciones seca y húmeda definidas y con largas temporadas de temperaturas altas (21-24), lo cual resulta en grandes densidades poblacionales y ejemplares con una mayor capacidad de dispersión hacia hábitats artificiales (22,24).

En el presente estudio se tuvieron en cuenta las condiciones climáticas publicadas por el *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), en especial las proyecciones del *Special Report on Emissions Scenarios* (SRES) de 2013-2014 (25) relativas a la temperatura ambiente (T_{amb}), la temperatura a dos metros del suelo (T_{2m}) y a nivel de superficie (T_{ms}).

La temperatura ambiente o del aire se define como la medida de calor sensible que se almacena en él (26) en un momento determinado, incluida su evolución espacio-temporal en un área dada. Esta es la base para la diferenciación de los tipos climáticos, en especial en la clasificación de Köppen (27), cuya sencilla división permite clasificar los climas como macrotérmicos, con temperaturas por encima de 18 °C a lo largo de todo el año; como mesotérmicos o templados, con temperaturas entre -3 y 18 °C; como más cálidos, con una temperatura por encima de los de 10 °C, y como microtérmicos o fríos, con temperaturas menores de 10 °C en todo el año.

En los últimos años ha aumentado el interés por los estudios de ecoepidemiología y epidemiología espacial, dada la facilidad que ofrecen los sistemas de información geográfica (SIG), el acceso a los datos provenientes de los sensores remotos (28-36) y el desarrollo de sistemas computacionales que permiten la aplicación de algoritmos complejos en un tiempo relativamente reducido mediante técnicas de modelado, discriminatorias, descriptivas y mixtas (37,38), y en diversas escalas espacio-temporales (39), lo cual ofrece una mejor perspectiva y una aproximación más realista a los factores de riesgo de la transmisión de enfermedades infecciosas (40).

En Colombia, se ha aplicado este tipo de herramientas, incluidas las técnicas geoestadísticas y las simulaciones de focos potenciales de infestación,

Correspondencia:
Gabriel Parra-Henao, Calle 10A N° 22-04, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 444 0555
gparrah@ces.edu.co

Recibido: 25/08/16; aceptado: 26/07/17

al estudio de *T. dimidiata* (12), y los datos obtenidos han servido para adoptar otros enfoques metodológicos (Parra-Henao G, Badel-Mogollón JE. Uso de SIG, SR y análisis espaciales para la generación de modelos predictores de distribución de triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de enfermedad de Chagas en Colombia. Biomédica. 2015;35 (Supl.4):28-30. Memorias, XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical). En este estudio de *T. dimidiata* en Colombia (12), se analizaron los factores ambientales determinantes de la distribución de la especie mediante un modelo de regresión logística de la probabilidad de presencia del vector desarrollado con el algoritmo MaxEnt. En él se encontró una asociación significativa entre la presencia del vector, los valores mínimos de la temperatura de la superficie terrestre, la mayor densidad de la cobertura vegetal en el área de estudio y la elevación del terreno, lo cual dio lugar a nuevas preguntas sobre las condiciones ambientales favorables a las poblaciones de *T. dimidiata*, en particular, y de los triatominos en general.

El algoritmo MaxEnt funciona como una caja negra, similar a los modelos cuyo método se basa en enfoques bayesianos y de redes neurales, a los modelos aditivos generalizados, y a los lineales generalizados (41). Pero aunque dicha aproximación permite entender mejor el conjunto y explicar claramente la presencia del vector en las áreas de recoleccion, su naturaleza como modelo del tipo de “caja negra” dificulta el conocimiento real de los valores y rangos de las variables que mejor explican la presencia del vector.

Teniendo en cuenta esta consideración, una vez conocidos los mayores focos potenciales de infestación, el paso siguiente ha sido explicar la presencia de *T. dimidiata*, pero con base en los valores observados en las variables biofísicas consideradas como de mayor relevancia y en otras que no se incluyeron en los modelos iniciales, pero que pueden ser importantes en la distribución del vector.

Además de explicar la distribución espacial de *T. dimidiata* en Colombia, también se procuró dilucidar algunos detalles de las fluctuación temporal de las poblaciones. Para ello se analizaron las series temporales de algunas variables físicas y ecológicas básicas utilizando las transformadas de Fourier (42).

El análisis armónico, o análisis de Fourier, se utiliza para el procesamiento digital de imágenes, principalmente en física e ingeniería, aunque hoy se aplica en muchos campos, desde la predicción de la tendencia de las llamadas en un centro policial (Lewis B, Herbert R, Bell R. The application of Fourier analysis to forecasting the inbound call time series of a call centre. Proceedings of the International Congress on Modeling and Simulation MODSIM03; Townsville, Australia. 2003. p. 1281-6), hasta el análisis en imágenes de las series temporales del índice de vegetación (43) y de diversos fenómenos ambientales (44).

En síntesis, el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones ecológicas en el área de influencia de los focos potenciales de infestación de *T. dimidiata* en la región andina con base en un análisis espacio-temporal, y su relación con diversas variables biofísicas y con la cobertura vegetal mediante el modelado geoestadístico, la simulación condicional y el análisis de Fourier.

Materiales y metodos

Área de estudio

Se elaboró una base de datos en la cual se registró la presencia de *T. dimidiata* en viviendas muestreadas en los municipios de Soatá y Tipacoque en el departamento de Boyacá, y Capitanejo, Enciso, Macaravita, Molagavita, San Vicente de Chucurí y San José, en el departamento de Santander.

Con base en la información geoestadística de las áreas con mayor presencia de *T. dimidiata* en Colombia, se escogió una zona del nororiente de la Región Andina localizada entre los 6,2° y 7,0° de latitud norte, y los 72,2° y 73,0°de longitud oeste, específicamente entre las subregiones naturales de las montañas santandereanas, el cañón de los ríos Chicamocha y Suárez, el sur del macizo de Santurbán, el nororiente de las laderas de la Cordillera Oriental y el norte de la planicie cundiboyacense (figura 1a). En estas coordenadas se localizan los municipios pertenecientes a los departamentos de Boyacá (Tipacoque y Soatá) y de Santander (Capitanejo, Enciso, Macaravita, Molagavita, San José y San Vicente de Chucurí), en donde se ubicaron los ocho puntos de recolección de triatominos.

La altitud de estos puntos fluctuó entre los 755 m y los 2.938 m (figura 1b), lo que supone una gran variación en los valores de la temperatura ambiente y de la superficial, entre otros, pues abarcan todos los pisos térmicos y condiciones climáticas, desde el clima templado seco del cañón del Chicamocha hasta los climas templados y fríos.

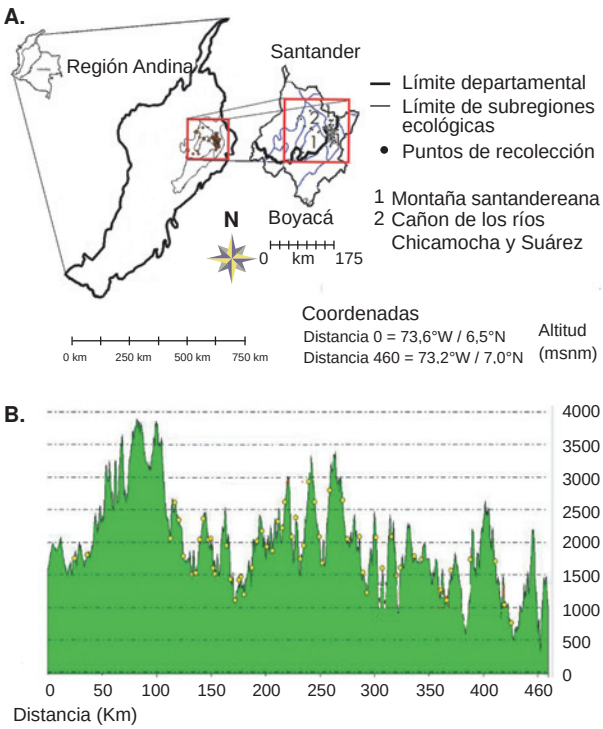


Figura 1. A. Región Andina de Colombia. En el recuadro se ve el área de recolección. **B.** Perfil altitudinal de los puntos de recolección de *T. dimidiata* en los ecótopos de la montaña santandereana (a) y el cañón del Chicamocha (b). En el recuadro se destaca con puntos amarillos la altitud de los puntos de recolección de *T. dimidiata*, incluidos el punto más elevado y el menos elevado, según la ruta mostrada en el mapa con el trazo sólido de color amarillo. Los trazos sólidos de color negro representan los límites de los ecótopos. Mapa elaborado a partir del modelo digital de elevación (MDE) del *SRTM Worldwide Elevation Data*, con 3 arcosegundos de resolución

Modelos de temperatura y humedad relativa media del ambiente en las áreas de recolección

Para el modelado descriptivo de las variables bioclimáticas a nivel macro, relevantes para explicar las condiciones ecológicas que rigen la distribución de *T. dimidiata* en el área de estudio, se utilizaron los datos del Modelo Climático Regional Eta-CPTEC del *Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais* (INPE) de Brasil, los cuales incluyen proyecciones sobre el cambio climático en Suramérica con una resolución espacial de 40 km para los períodos de 1961 a 1990 y de 2010 a 2100 en las condiciones de medias de emisiones SRES A1B (45) del modelo global *Hadley Centre Coupled Model,* versión 3 (HadCM3), ofrecidas por el *Metoffice Hadley Centre* (MOHC) del Reino Unido en el escenario A1B, es decir, crecimiento económico y poblacional rápido en un mundo globalizado (acentuada interacción y convergencia entre países).

El modelo HadCM3 es del tipo atmósfera-océano, de resolución atmosférica vertical terrestre de 19 niveles y 14 bandas espectrales, y no necesita ningún tipo de ajuste de flujo para producir buenas simulaciones; el modelo funciona con base en el concepto de *Perturbed Physics Ensembles* (PPE). En el artículo de Gordon, *et al.* (46), puede hallarse una descripción detallada del modelo.

Se tuvieron en cuenta los datos del subconjunto de control de las situaciones en que la temperatura es un parámetro resultante de la media de algunas de sus variables: temperatura ambiente (T_{amb}), temperatura a dos metros de la superficie del suelo (T_{2m}), temperatura a nivel de la superficie del suelo (T_{ms}) y temperatura en el suelo cubierto (T_{sc}). La última variable estudiada en el marco del modelo HadCM3 fue la humedad relativa media del ambiente.

Pluviosidad y cobertura vegetal

Además del modelo HadCM3, también se consideró la pluviosidad en el área de los puntos de recolección. Los valores de la pluviosidad correspondieron a los datos de la precipitación mensual acumulada registrados por la *Tropical Rainforest Measuring Mission* (TRMM), producto 3B43V6, con resolución espacial de 5 km, disponible para cualquier coordenada geográfica de Suramérica. Los datos de la TRMM son distribuidos por el *Data and Information Services Center* (DISC) del *Distributed Active Archive System* (DACC), a través de *Goddard Earth Sciences* (GES) de la NASA.

Dichos datos se interpretaron conforme a los resultados obtenidos en los análisis estadísticos descriptivos y de acuerdo con la geolocalización de cada área de muestreo, y luego se compararon con los obtenidos para los departamentos y se interpretaron conforme a los rangos de valores reportados en la bibliografía correspondiente.

Como variable ecológica, se tuvo en cuenta la densidad de la cobertura vegetal según los resultados de la aplicación de la versión 2 del índice mejorado de vegetación (*Enhanced Vegetation Index* 2, EVI2), el cual se aplica utilizando la siguiente fórmula (47):

$$EVI2 = 2.5 * \frac{NIR - Red}{(NIR + 2.4 * Red + 1)},$$

donde *NIR* corresponde a la banda infrarroja cercana del espectro electromagnético y *Red*, a la banda roja del espectro.

La principal ventaja de este índice es que no se ve afectado por puntos de saturación, como puede suceder con el clásico índice normalizado diferencial de la vegetación (*Normalized Difference*

Vegetation Index, NDVI), lo cual lo hace ideal para su uso en áreas de vegetación muy densa, como sucede en los trópicos (47-49).

El cálculo del EVI2 se hace con imágenes MODIS del producto MOD13, colección 005, con resolución espacial de 250 m. Los datos MODIS son distribuidos por el *Land Processes Distributed Active Archive Center* (LP-DAAC) de la *US Geological Survey* (USGS), del centro *Earth Resources Observation and Science* (EROS) (https://lpdaac.usgs.gov).

Los datos de este cálculo se obtuvieron del *Laboratorio de Sensoriamento Remoto Aplicado à Agricultura e Floresta* (LAF), del INPE de Brasil (http://www.dsr.inpe.br/laf/). En diversos trabajos llevados a cabo en zonas tropicales, se ha sugerido que las amplitudes en los armónicos son bajas cuando se aplica el EVI2 en bosques primarios y secundarios.

Todas las variables se evaluaron en los meses de mayo (mes de muestreo en el departamento de Boyacá en el 2007) y de junio (mes de muestreo en el departamento de Santander en el mismo año). Al no disponerse de series de datos del 2007 en el modelo HadCM3, se recurrió a las series de los años 2010 a 2015, tanto para las áreas de recoleccion de *T. dimidiata* como para las regiones ecológicas de los departamentos incluidos. Estas series se validaron con las series de datos del HadCM3 para esos meses entre 1981 y 1990. Los datos de los productos MODIS y TRMM se validaron con las series de los años 2000 a 2006 y 2008 a 2014, respectivamente.

Análisis armónico

Para el análisis de un conjunto discreto de datos, se aplica la transformada discreta de Fourier (TDF). En este caso, se empleó específicamente la transformada rápida de Fourier (FFT), que es un algoritmo de eficiencia computacional para calcular la TDF, así como el lenguaje Python, por el fácil manejo de sus comandos y su amplia librería científica (SciPy).

En la ventana de tiempo objeto de análisis, la transformada de Fourier arroja dos valores: una amplitud que indica la intensidad de variación de la serie temporal asociada a la periodicidad del evento, y una fase que toma valores entre 0 y 2π para indicar el momento en el periodo en que se da la máxima variación.

Las series de Fourier responden a la siguiente ecuación básica:

$$F\left(\frac{n}{NT}\right) = \frac{1}{N}\sum_{k=0}^{N=1} m(kT)e^{-j\frac{2\pi nk}{N}},$$

donde *N* es el número de muestras de la ventana que se va a analizar, *T* es el período de muestreo, *F* es la frecuencia de muestreo, *n* es el índice de la frecuencia cuyo valor se quiere obtener, y *m (kT)* indica la muestra tomada en el instante *kT* (muestra '*k*ésima') de la ventana.

Entre las coordenadas 6,2° y 7,4° N y 71,8° y 73,0° O en Boyacá y Santander, se obtuvieron datos mensuales de pluviosidad y cobertura vegetal desde enero de 2001 hasta diciembre de 2012 en 49 localidades diferentes. Se aplicó la transformada de Fourier a cada localidad y se graficó el resultado del espectro de amplitud de la ondas en función del tiempo, lo cual permite una mejor comprensión de la periodicidad de dicho patrón en la señal y la detección de algún posible patrón en las variables bioclimáticas que pueda tener relación con el ciclo de vida de *T. dimidiata* y facilite la adopción de decisiones relacionadas con su control.

Resultados

Los datos mostraron que en Santander no se recolectaron ejemplares del vector en el domicilio, sino en ecótopos del peridomicilio o el extradomicilio, en tanto que en los municipios boyacences se encontraron en el domicilio.

En Boyacá hubo 98 reportes de triatominos en 28 casas en el municipio de Soatá y 24 en sendas casas de Tipacoque. En San Vicente de Chucurí, Santander, se obtuvieron 17 reportes en cinco casas; en Macaravita, ocho en una casa; en Molagavita, nueve en una vivienda; en Enciso, seis en una vivienda; en Capitanejo, 50 en seis casas, y en San José, seis reportes en una vivienda. Los datos de los municipios de Boyacá correspondieron al mes de mayo, y las de Santander, al mes de junio de 2007.

Temperatura ambiente media

En el cuadro 1a, en la franja latitudinal más ecuatorial de las localidades de muestreo (6,2° y 6,6°N), se observa que la temperatura ambiente (T_{amb}) media en los meses de mayo y junio de 2010 a 2015 osciló entre 29,3 y 33,1°C. Esta franja se encuentra en el rango que, según la literatura, favorece ciclos de vida cortos en los triatominos (temperatura superior a 28 °C) (21-24).

Según el rango de los valores mínimos y máximos, principalmente en los cuartiles inferior y superior, la temperatura ambiente en esta zona y en esos

Cuadro 1. Estadística descriptiva de los valores de: T_{amb}, T_{2m} y T_{ms} (° C) entre 2010 y 2015 en las áreas de recolección de *T. dimidiata*

Mes / Latitud (N) y Longitud (O)	n	$\bar{X}$	Min	Max	c_i	c_s	S	Sk	K
T_{amb}									
Mayo, 7,0° N / 7,4° N									
72,6° O / 73,0° O	6	32,6	31,7	33,1	32	33,1	0,6	-1	-1,5
72,2° O / 72,6° O	6	33,3	31,7	34,7	32,5	34	1,1	-0,3	-0,9
71,8° O / 72,2° O	6	31,0	30,2	31,8	30,8	31,2	0,5	0,0	1,2
Mayo, 6,6° N / 7,0° N									
72,6° O / 73,0° O	6	32,1	31,3	32,6	31,8	32,4	0,4	-0,8	0,0
72,2° O / 72,6° O	6	33,0	31,7	34,1	32,6	33,5	0,8	-0,6	0,6
71,8° O / 72,2° O	6	31,9	30,7	33,4	31,7	31,9	0,9	0,9	2,8
Mayo, 6,2° N / 6,6° N									
72,6° O / 73,0° O	6	32,7	31,8	33,2	32,5	33	0,5	-1,4	1,8
72,2° O / 72,6° O	6	33,1	31,9	33,9	32,9	33,6	0,7	-1	1,5
71,8° O / 72,2° O	6	31,3	30,4	32,4	30,9	31,5	0,7	1,1	2,1
Junio, 7,0° N / 7,4° N									
72,6° O / 73,0° O	5	32,7	31,3	33,9	32	33,1	1	-0,3	-0,9
72,2° O / 72,6° O	5	31,8	30	32,9	31	32,7	1,2	-0,8	-1,4
71,8° O / 72,2° O	5	29,9	29	30,7	29,4	30,4	0,7	-0,3	-1,6
Junio 6,6° N / 7,0 N									
72,6° O / 73,0° O	5	32,2	31,2	33,2	31,6	32,5	0,8	-0,2	-1,4
72,2° O / 72,6° O	5	31,3	29,9	32,3	30,5	32,1	1,1	-0,6	-2,3
71,8° O / 72,2° O	5	29,4	28,2	30,5	28,9	30	0,9	-0,3	-1,3
Junio 6,2° N / 6,6° N									
72,6° O / 73,0° O	5	32,2	30,9	33,3	31,5	32,8	1,0	-0,5	-1,4
72,2° O / 72,6° O	5	31,1	29,8	32,1	30,3	31,9	1,0	-0,6	-2,3
71,8° O / 72,2° O	5	29,3	28,3	30,1	29	29,6	0,7	-0,4	0,3
T_{2m}									
Mayo 7,0° N / 7,4° N									
72,6° O / 73,0° O	6	17,4	16,4	18,3	17,0	17,6	0,6	-0,1	0,7
72,2° O / 72,6° O	6	11,9	10,8	13,2	11,5	12,2	0,8	0,4	1,2
71,8° O / 72,2° O	6	18,5	17,8	19,2	18,2	18,8	0,5	-0,2	-0,6
Mayo 6,6° N / 7,0° N									
72,6° O / 73,0° O	6	18,8	18,0	19,5	18,4	19,0	0,5	0,1	0,3
72,2° O / 72,6° O	6	12,0	11,0	13,2	11,7	12,3	0,7	0,4	1,3
71,8° O / 72,2° O	6	12,7	11,6	13,8	12,3	13,1	0,7	0,3	0,7
Mayo 6,2° N / 6,6° N									
72,6° O / 73,0° O	6	14,1	13,2	15,2	13,8	14,4	0,7	0,4	1,2
72,2° O / 72,6° O	6	10,8	9,7	12,2	10,6	11,1	0,8	0,5	1,8
71,8° O / 72,2° O	6	14,4	13,5	15,8	14,1	14,4	0,8	1,3	3,1
Junio 7,0° N / 7,4° N									
72,6° O / 73,0° O	5	16,8	16,5	17,1	16,57	16,98	0,26	-0,09	-2,39
72,2° O / 72,6° O	5	10,9	10,4	11,64	10,51	11,01	0,49	0,76	0,19
71,8° O / 72,2° O	5	17,6	17,3	17,97	17,35	17,88	0,32	0,65	-3,04
Junio 6,6° N / 7,0° N									
72,6° O / 73,0° O	5	18,26	18,02	18,45	18,12	18,43	0,19	-0,27	-2,35
72,2° O / 72,6° O	5	11,12	10,71	11,75	10,72	11,21	0,43	0,68	-0,14
71,8° O / 72,2° O	5	11,72	11,29	12,32	11,36	11,91	0,42	0,56	-0,8
Junio 6,2° N / 6,6° N									
72,6° O / 73,0° O	4	13,13	12,91	13,36	12,92	13,35	0,25	0,01	-5,91
72,2° O / 72,6° O	4	9,56	9,24	9,86	9,28	9,83	0,32	-0,03	-5,64
71,8° O / 72,2° O	4	13,46	13	13,8	13,16	13,77	0,38	-0,56	-2,7
T_{ms}									
Mayo 7,0° N / 7,4° N									
72,6° O / 73,0° O	6	20,1	17	22,1	18,6	22,1	2	-0,5	-1
72,2° O / 72,6° O	6	16,4	15,3	17,3	15,7	17,1	0,8	-0,1	-3
71,8° O / 72,2° O	6	17,9	15,6	20	15,9	19,3	1,9	-0,4	-2
Mayo 6,6° N / 7,0° N									
72,6° O / 73,0° O	6	20,7	16,9	22,8	18,6	22,4	2,4	-1	-1
72,2° O / 72,6° O	6	17	15,1	18,1	16,8	18	1,1	-1	2
71,8° O / 72,2° O	6	18,5	16,2	20,5	17,4	19,6	1,6	0	-1
Mayo 6,2° N / 6,6° N									
72,6° O / 73,0° O	6	19,8	16,9	21,5	17,1	21,4	2,2	-0,9	-2
72,2° O / 72,6° O	6	15,2	14,8	15,7	15	15,4	0,3	-0,2	0
71,8° O / 72,2° O	6	17	14,6	18,8	14,9	18	1,8	-0,8	-2
Junio 7,0° N / 7,4° N									
72,6° O / 73,0° O	5	20,6	18,1	22	20,3	21,8	1,6	-1	1
72,2° O / 72,6° O	5	16,1	15,3	16,7	15,5	16,5	0,6	-1	-3
71,8° O / 72,2° O	5	17,6	14,7	19,9	16	18,9	2,2	-1	-2
Junio 6,6° N / 7,0° N									
72,6° O / 73,0° O	5	19,6	17,1	21	19,4	20,2	1,5	-1	2,4
72,2° O / 72,6° O	5	16	15,2	18,4	15,3	15,6	1,4	2	4,7
71,8° O / 72,2° O	5	18,1	15,1	20,6	17,4	19,1	2	-1	0,6
Junio 6,2° N / 6,6° N									
72,6° O / 73,0° O	5	19,2	16,5	20,8	16,9	20,8	2,3	-1	-3
72,2° O / 72,6° O	5	15,1	14,4	15,5	15,1	15,4	0,5	-1	2
71,8° O / 72,2° O	5	16,6	14	18,6	14,8	18,4	2,1	0	-3

n: número de casos; $\bar{X}$: media aritmética; Min: valor mínimo; Max: valor máximo; c_i: cuartil inferior; c_s: cuartil superior; S: desviación estándar; Sk: asimetría; K: curtosis (apuntamiento). Coeficiente de asimetría de Fisher (g1): g1>0, positivo; g1=0 ±0,5, simétrico; g1<0, negativo. Coeficiente de curtosis (g2): g2=0 ±0,5, mesocúrtica; g2>0, leptocúrtica; g2<0, platicúrtica

meses es relativamente estable, lo cual satisface las necesidades de los triatominos. En general, el mínimo observado fue de 28,3 °C y el máximo fue de 33,9 °C.

Los resultados estadísticos indicaron que el coeficiente de asimetría de los valores de la temperatura del mes de mayo de los años 2010 a 2015 se agruparon por debajo de la media observada para cada área, pero nunca por debajo de 28 °C.

Con respecto al mes de junio, los valores se distribuyeron de forma relativamente simétrica en la mayoría de las coordenadas longitudinales (oriente-occidente). En otras palabras, en junio los valores fueron algo más dispersos que en mayo, lo cual permitiría concluir que, comparativamente, en junio se presentarían ciclos de vida más cortos en los triatominos.

Por otro lado, al comparar los meses de mayo y junio, los resultados indicaron que en el área comprendida entre los 7,6°N y 73°O, franja en la que se localiza el municipio de Soatá (Boyacá), las condiciones ambientales en mayo eran más estables para las necesidades del ciclo de vida de los triatominos.

El coeficiente de curtosis indicó que, en la mayoría de las franjas longitudinales, la distribución fue muy apiñada (leptocúrtica) en mayo, y fue muy dispersa (platicúrtica) en junio, lo cual concuerda con la interpretación del coeficiente de asimetría, dado el acentuado grado de concentración de los valores de la temperatura en mayo y la condición inversa en junio.

Una dispersión similar de los valores de la T_{amb} se observó en las franjas longitudiales del rango latitudinal entre los 6,6° y los 7,0°N, y en los rangos longitudinales entre los 72,6° y los 73,0°O y los 73,0° y los 73,4°O, donde se encuentran las condiciones más estables para los triatominos. En estas franjas de latitud y longitud, se localizan los municipios de Capitanejo, Macaravita, Tipacoque y Molagavita. En la franja longitudinal entre los 73,0° y los 73,4°O, se localiza el municipio de San Vicente de Chucurí, localidad con índices de infestación por triatominos de entre 5 y 7%.

El comportamiento interanual de la media de la T_{amb} (figura 2a) entre 2010 y 2015 sugiere que en junio hubo una inversión en los valores correspondientes a la franja longitudinal de los 72,6°O con respecto a la de los 73,0°O, en tanto que, en la franja longitudinal más hacia el oriente de la cordillera, se registraron menores valores en todos los casos. En cuanto a sus características geográficas, esa franja es la más influenciada por la zona de alta montaña del Parque Nacional Natural El Cocuy.

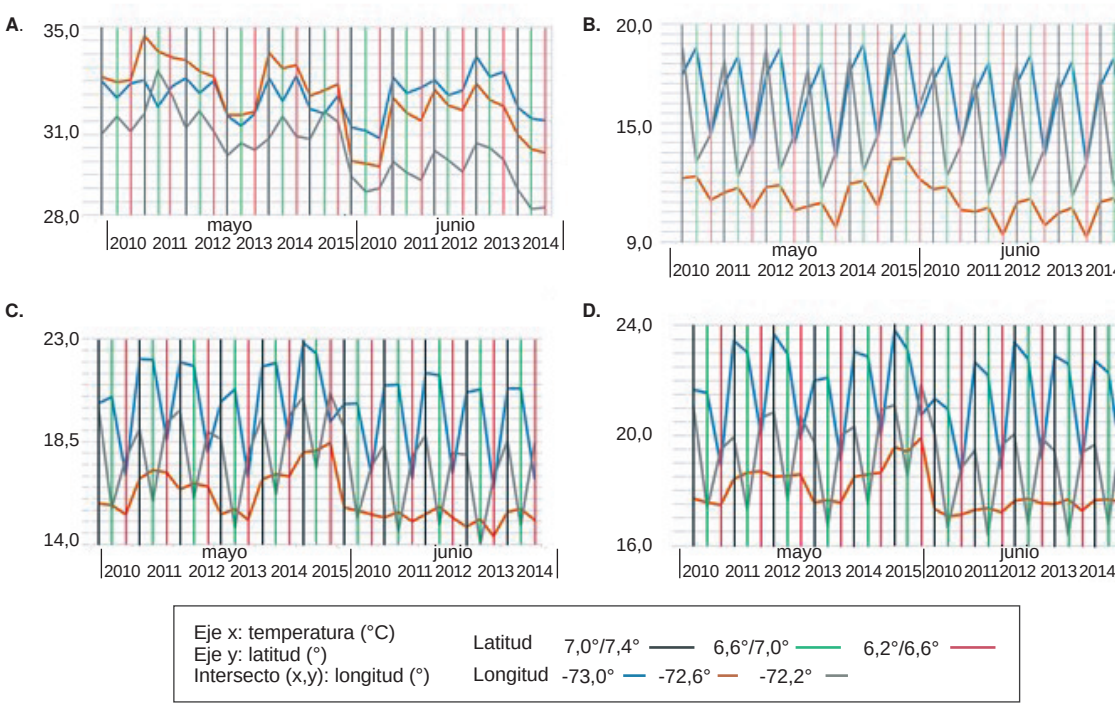


Figura 2. Valores de la T_{amb} **(A)**, T_{2m} **(B)**, T_{ms} **(C)** y T_{sc} **(D)** en las diferentes franjas latitudinales y longitudinales en los meses de mayo y junio entre 2010 y 2015

En la figura 3 a y b, se observa cómo de mayo a junio se registró un desplazamiento espacial de los valores máximos y mínimos de la temperatura media hacia el oeste de las ecorregiones, lo cual implica una exposición de los triatominos localizados en la ladera occidental de la Cordillera Oriental y la frontera norte de la montaña santandereana y el oriente del cañón de los ríos Chicamocha y Suárez a temperaturas algo más bajas; este sector tiene los registros más bajos del vector según la base de datos utilizada. Una situación inversa se presentó con las poblaciones de triatominos localizados en la porción nororiental del Magdalena Medio, y las localizadas en la región central del cañón, es decir, las áreas en las que los puntos de reporte fueron más dispersos.

Temperatura promedio a dos metros de la superficie del suelo

Es evidente que la temperatura constituye un parámetro biofísico de primer orden para comprender la ecología de los triatominos. Hasta ahora se había logrado inferir las condiciones generales de la temperatura media en las áreas donde hay registro de *T. dimidiata*, es decir, en una escala vertical grosera, lo que es importante para interpretar el

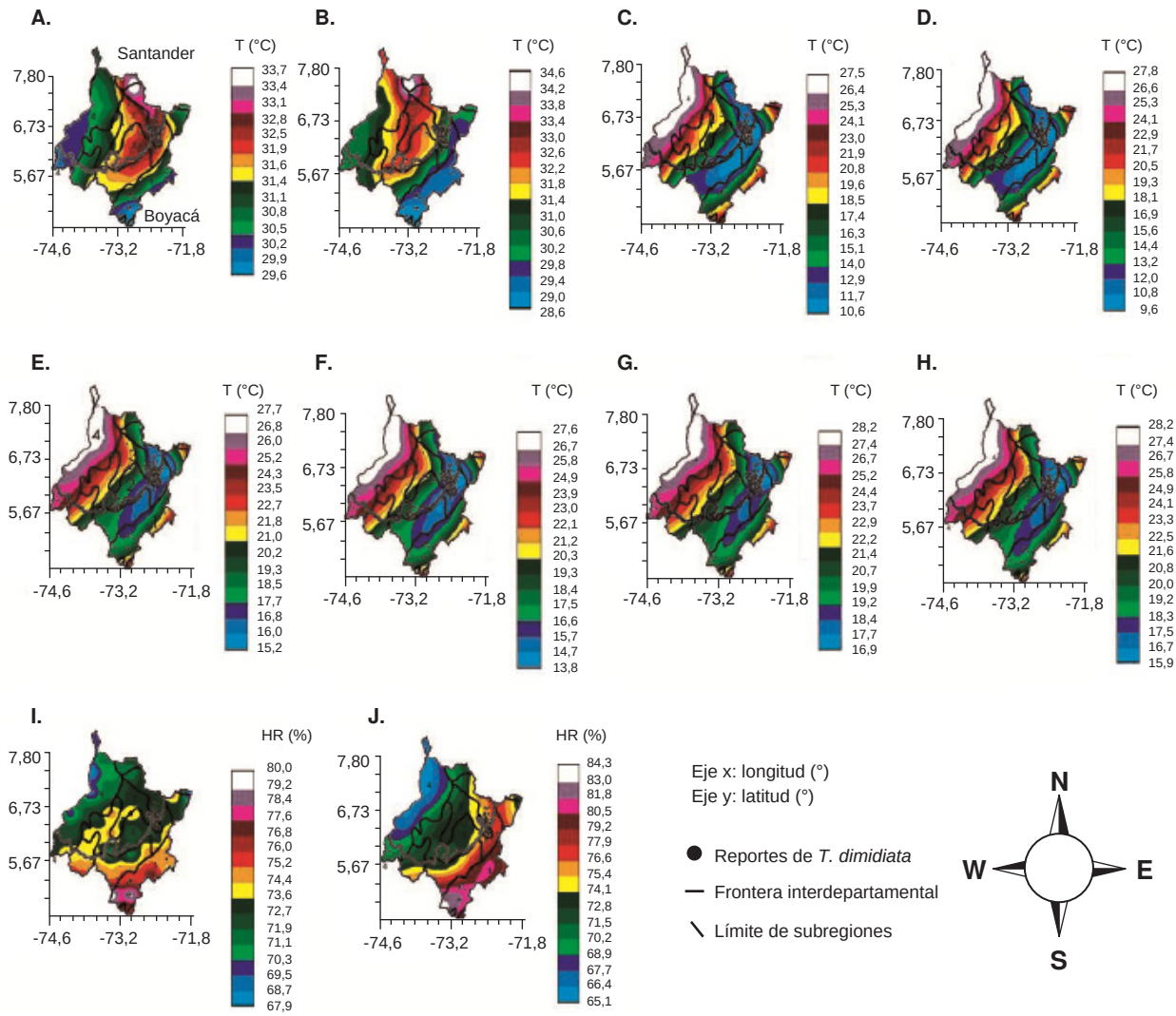


Figura 3. Mapas resultantes de la interpolación por *krigeage* del promedio de los años 2010 y 2015 para laT_{amb} de mayo **(A)** y junio **(B)**; la T_{2m} de mayo **(C)** y junio **(D)**; la T_{ms} de mayo **(E)** y junio **(F)**; la T_{sc} de mayo **(G)** y junio **(H).** Interpolación por *krigeage* de la humedad relativa para mayo **(I)** y junio **(J).**
(1) Ladera occidental de la Cordillera Central; (2) montaña santandereana; (3) cañón de los ríos Chicamocha y Suárez; (4) Magdalena Medio. Los puntos indican los sitios de recolección de *T. dimidiata*. Distancia de separación en grados decimales en los variogramas isotrópicos. Resolución espacial: 40 km

contexto ambiental de los biotopos donde estos triatominos están presentes. Sin embargo, como se puede deducir de los trabajos en campo y en el laboratorio ya citados, los triatominos responden a variaciones bien localizadas del ambiente.

Por consiguiente, se impone mejorar la resolución horizontal y la vertical de la temperatura, o ambas. En este caso, el modelo escogido cuenta con una serie de variables que mejoran la resolución vertical de este parámetro, en tanto que el ajuste de la resolución horizontal se plantea para futuros estudios. A continuación se presentan los resultados conforme a los valores medios de la temperatura promedio a dos metros del suelo (T_{2m}) en los ecótopos y localidades con presencia de *T. dimidiata*.

En todos los rangos latitudinales y longitudinales de las áreas de muestreo, fue posible observar valores medios de temperatura significativamente más bajos que la media de la temperatura ambiente general, tanto en mayo como en junio (cuadro 1b).

La temperatura mínima (9,2 °C) registrada en junio sugiere que esta variable pudo llegar a ser entre 19 y 20°C más baja que la mínima registrada para la temperatura ambiente (29,4 °C). Por lo tanto, la temperatura media registrada para la zona más densamente poblada por vectores (9,6 °C), correspondió a la media más baja registrada entre las franjas latitudinales y longitudinales consideradas en el estudio. Estos registros mínimos de la temperatura media coincidieron con el mínimo reportado como el límite de temperatura inferior soportable para los triatominos de regiones latitudinales más septentrionales, como lo sugieren Galvão, *et al*. (50).

En la figura 2b se puede observar la variación anual de los valores medios de la T_{2m}. En la figura se observa también que: (i) en la franja longitudinal de los 72,2°O y los 72,6°O, siempre se presentó la menor media de T_{2m}; (ii) en esta misma longitud, la franja latitudinal más ecuatorial (6,2° y 6,6°N) siempre presentó la menor media de temperatura; (iii) en mayo se presentaron los picos más altos de T_{2m}; (iv) en la franja latitudinal (6,2° y 6,6°N), la diferencia de temperatura entre la franja (72,2° a 72,6°O) y sus vecinas, fue regular y, aproximadamente, 3,5 °C menor tanto en mayo como en junio.

En la figura 3, c y d, correspondientes a mayo y junio, respectivamente, se observa claramente la variación de la T_{2m} entre las subregiones ecológicas de los departamentos en cuestión. En estos mapas puede verse que la zona de menor T_{2m} media forma lo que se podría llamar una depresión de la temperatura a nivel espacial (áreas en azul de la figura 3, c y d), lo cual coincide en cuanto a su orientación y localización (SO-NO) con la cuenca del río Sogamoso, en un área encañonada que colinda hacia el noreste con el nudo de Santurbán y hacia el este con la Sierra Nevada del Cocuy, cuyas elevaciones superan los 2.500 y 3.000 msnm, en tanto que en su costado oeste puede llegar a elevaciones por encima de los 2.000 msnm.

Temperatura media de la superficie del suelo

Los menores valores medios de la temperatura media de la superficie del suelo (T_{ms}) (15,2 °C en mayo y 15,1 °C en junio), se encontraron justamente en las franjas latitudinal y longitudinal donde se reportó la presencia de *T. dimidiata* durante la época estudiada (latitud: 6,2° y 6,6°N; longitud: 72,2° y 72,6°O). Por otro lado, en la franja latitudinal y en la longitudinal (7,0° y 7,4°N; 73,0° y 73,4°O) donde no ha habido reportes de triatominos, o son más escasos, se presentaron los mayores valores medios de T_{ms} (cuadro 1c).

En la figura 2c se aprecia la fluctuación de la T_{ms} en cada franja latitudinal y longitudinal en el periodo de 2010 a 2015. Puede constatarse que los menores valores de temperatura media se registraron en la franja con más reportes del vector (latitud: 6,2° y 6,6°N; longitud: 72,2° y 72,6°O) tanto en mayo como en junio.

Para confirmar lo que hasta ahora se ha planteado, puede recurrirse a los datos de la temperatura en el suelo cubierto (T_{sc}) (figura 2d), los cuales revelan que la T_{sc} media fue, por lo menos, 2 °C más alta que la media de la T_{ms}, y en algunas localidades, hasta 6 °C más alta aun cuando siguió prácticamente el mismo patrón de las fluctuaciones encontradas en el lapso estudiado y en cada franja latitudinal y longitudinal.

La interpolación de los valores según las subregiones ecológicas de los dos departamentos permite ver que la variación de la T_{ms} (figura 2c, d) siguió el mismo patrón espacial de la T_{sc} (figura 2e, f), aunque con una media 2 °C más alta, aproximadamente. Este mismo patrón de distribución espacial se observó en los valores de la T_{2m}, pero a temperaturas más bajas, lo cual sugiere una variación resultante de estas tres variables a nivel local y regional.

Densidad de la cobertura vegetal y pluviosidad

Se observó que, comparativamente, la densidad promedio de la cobertura vegetal en las áreas de muestreo de Santander fue mayor que en Boyacá

(cuadro 2). Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, según la base de datos utilizada no hubo recoleccion del vector domiciliado en Santander, pues todos los ejemplares recolectados correspondían al vector selvático, mientras que en los municipios boyacences se dio el caso inverso, tanto en los biotopos simplificados y marcadamente antrópicos (figura 4a) como en aquellos con una cobertura vegetal densa (figura 4b), correspondiente a una matriz de bosques fragmentados, como puede inferirse de los valores del EVI2 obtenidos punto a punto (figura 4b).

En condiciones normales, la alta pluviosidad en el trópico se asocia con una mayor densidad de la cobertura vegetal. En este caso, los valores de la precipitación de los municipios boyacences fueron significativamente más altos que los observados en los municipios santandereanos (figura 4c), por lo que cabía esperar valores del EVI2 más altos en los lugares de muestreo de Boyacá. Se evidenció que los valores del EVI2 en los sitios de muestreo en este departamento correspondían a áreas cuya cobertura vegetal se ha visto sometida a la intervención del hombre, transformándose en formas más simplificadas y menos densas en comparación con los lugares de muestreo en Santander, aspecto que se puede confirmar visualmente en las imágenes satelitales correspondientes.

Análisis armónico de la densidad de la cobertura vegetal y la pluviosidad

Otra situación que se detectó y que vale la pena explorar, fue el comportamiento de las variables físicas y ecológicas a lo largo del año, lo cual es uno de los factores determinantes en la fluctuación de las poblaciones de *T. dimidiata* y que, en el presente estudio, se expresaron en los armónicos de la densidad, de la precipitación mensual y la cobertura vegetal (EVI2).

Cuadro 2. Estadística descriptiva de los valores del EVI2 y la pluviosidad entre 2010 y 2015 en las áreas de recolección de *Triatoma dimidiata*

Variable Departamento	n	$\overline{X}$	Min	Max	c_i	c_s	S	Sk	K
EVI2									
Boyacá	76	0,4	0,1	0,5	0,3	0,4	0,1	-1,5	3,6
Santander	24	0,5	0,4	0,7	0,5	0,6	0,1	0,6	-0,6
Pluviosidad									
Boyacá	2	231	231	231	231	231	0		
Santander	7	152	141	172	149	154	9,4	1,5	3,6

n: número de casos; $\overline{X}$: media aritmética; Min: valor mínimo; Max: valor máximo; c_i: cuartil inferior; c_s: cuartil superior; S: desviación estándar; Sk: asimetría; K: índice de curtosis (apuntamiento)

Los datos de la pluviosidad y del EVI2 en los diferentes sectores exhibieron un patrón muy similar, con una máxima variación en los periodos de 12 y 24 meses, siendo más predominante este último.

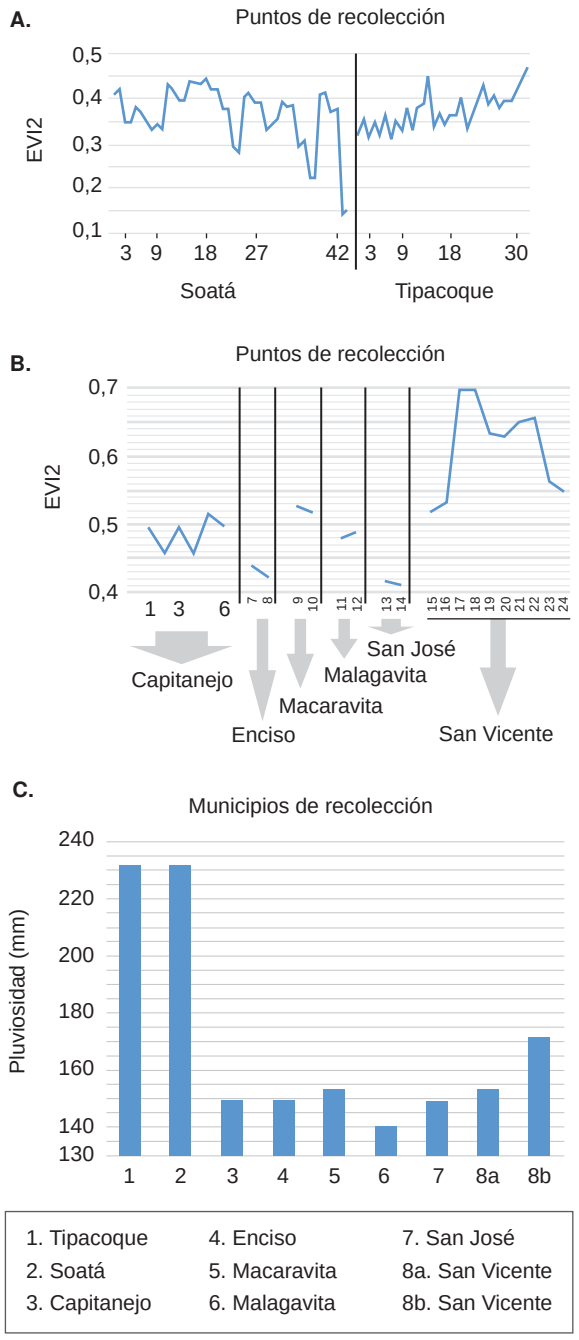


Figura 4. Valores del EVI2 en los puntos de recolección de *T. dimidiata* en municipios de Boyacá **(A)** y Santander **(B)** en mayo y junio de 2007. Valores de **(A)** y **(B)** conforme al promedio mensual de imágenes MODIS, producto MOD13, colección 005, resolución espacial de 250 m; valores de **(C)** conforme al acumulado mensual para ambos departamentos en sensor TRMM, resolución espacial de 5 km

En el cuadro 3, a y b, se presentan la amplitud y las fases de la pluviosidad y de la cobertura vegetal, respectivamente. A pesar de que los datos del muestreo de las distintas localidades fueron diferentes entre sí, se encontró que los patrones de variación de los datos de pluviosidad fueron los mismos, es decir, en todos los lugares la variación de las lluvias siguió los mismos patrones para los periodos bienal y anual, conforme se observa en la figura 5, a y b.

De los datos del cuadro 3 se desprende que en el período anual se presentó una mayor variación alrededor de noviembre y, en el bienal, la máxima se dio en el mes de agosto del segundo año (2002).

Algo similar ocurrió con los índices de cobertura vegetal en cada localidad, que si bien no obedecieron exactamente al mismo patrón, registraron la misma tendencia, aunque con diferentes intensidades de variación en los periodos anuales y bienales, lo cual permite a las poblaciones de *T. dimidiata* desarrollarse tanto en biotopos simplificados y acentuadamente antrópicos (figura 4a) como en biotopos con cobertura vegetal densa (figura 4b). A manera de ejemplo, se presentan dos casos: la localidad de Enciso en Santander y la de Tipacoque en Boyacá (figura 5, c, d, e y f).

En el cuadro 3b se observa la fase de los dos periodos. En Tipacoque, el máximo anual se dio hacia el mes de octubre en el periodo bienal, y su máximo se registró entre noviembre y diciembre del primer año (2001). En Enciso, se observó un pico a mediados de noviembre en su periodo anual, y en el periodo bienal el máximo ocurrió alrededor del mes de mayo del segundo año (2002).

Humedad relativa media

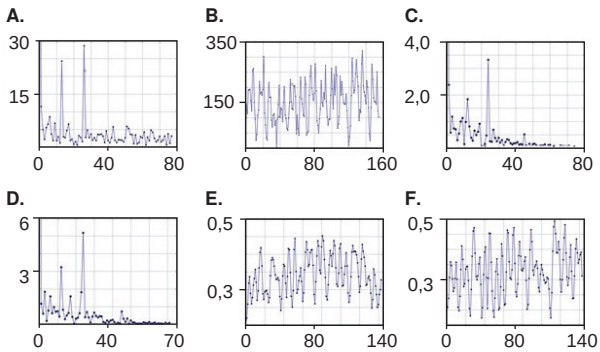
La humedad relativa fue alta en todas las latitudes y longitudes geográficas (cuadro 4) y en los dos meses, inclusive al considerar los mínimos observados. Los valores, correspondientes al período de 2010 a 2015, fluctuaron entre 66,8 y 85,1 %, lo cual indica una alta pluviosidad en la zona, por lo que se asumió que las condiciones climáticas no difirieron mucho de las encontradas en el 2007, año en que se efectuaron las actividades de muestreo.

En la figura 3, i y j, se presenta el comportamiento espacial de la humedad relativa media y puede observarse cierta tendencia al incremento en la franja longitudinal correspondiente a los 72,2° y los 72,6°O, es decir, aquella donde la temperatura media del ambiente se mostró ligeramente menor, lo cual fue más evidente en los valores correspondientes a junio.

La concentración de *T. dimidiata* en refugios más secos podría resultar en la infestación del domicilio a partir de los remanentes de bosques cercanos en áreas que, como la zona de estudio, han estado sometidos a cambios antrópicos. Esto, a su vez, sugiere que puede haber una mayor incidencia en la ingestión de sangre y, consecuentemente, un aumento en el tamaño de las poblaciones. En las figuras también se observa un aumento espacial del porcentaje de humedad relativa entre mayo y junio,sobre todo en las áreas correspondientes

Cuadro 3. Parámetros de los dos armónicos principales de pluviosidad para la localidad de Capitanejo **(a)**, y parámetros de los dos armónicos principales de la cobertura vegetal para las localidades de Tipacoque y Enciso **(b)**

Municipio	Periodo	Amplitud	Fase
(a) Armónico de la pluviosidad			
Capitanejo	12	243,138	305,254
	24	286,300	276,250
(b) Armónico del EVI2			
Enciso	12	184,574	313,499
	24	332,681	231,852
Tipacoque	12	324,080	279,144
	24	517,742	161,842



Eje x: tiempo (mes)
Eje y: (A, C, D) = amplitud; (B) = pluviosidad (mm);
(E, F) = EVI2

Figura 5. (A) Espectro de amplitudes de la transformada de Fourier en función del tiempo y la pluviosidad. **(B)** Espectro de amplitudes de la transformada de Fourier en función del tiempo y de los datos de pluviosidad en Capitanejo. **(C)** Espectro de amplitudes de la transformada de Fourier en función del tiempo y de los datos de pluviosidad en Enciso. **(D)** Espectro de amplitudes de la transformada de Fourier en función del tiempo y de los datos de pluviosidad en Tipacoque. **(E)** Espectro de amplitudes de la transformada de Fourier en función del tiempo y de los datos del EVI2 en Enciso. **(F)** Espectro de amplitudes de la transformada de Fourier en función del tiempo y de los datos del EVI2 en Tipacoque

Cuadro 4. Estadística descriptiva de los valores de humedad relativa entre 2010 y 2015 en las áreas de recolección de *Triatoma dimidiata* entre las latitudes 6,2° y 6,6°N y entre las longitudes 72,2° y 73,0°O

Latitud (N)/Longitud (O)	n	$\overline{X}$	Min	Max	c_i	c_s	S	Sk	K
Mayo Lat 7,0°									
73,0°/73,4°	6	73,1	69,9	76,8	71,5	74,6	2,6	0,3	-1,0
72,6°/73,0°	6	73,2	69,4	79,9	70,0	76,4	4,2	0,9	-0,5
72,2°/72,6°	6	75,0	71,1	81,7	71,9	79,3	4,4	1,0	-1,2
Junio Lat 7,0°									
73,0°/73,4°	6	73,1	69,9	76,8	71,5	74,6	2,6	0,3	-1,0
72,6°/73,0°	6	73,2	69,4	79,9	70,0	76,4	4,2	0,9	-0,5
72,2°/72,6°	6	75,0	71,1	81,7	71,9	79,3	4,4	1,0	-1,2
Mayo Lat 6,6°									
73,0°/73,4°	6	74,1	71,3	77,9	72,3	75,3	2,4	0,6	-0,4
72,6°/73,0°	6	72,5	68,3	78,8	69,1	76,0	4,1	0,7	-0,9
72,2°/72,6°	6	73,3	69,0	80,1	70,8	77,9	4,5	0,9	-1,2
Junio Lat 6,6°									
73,0°/73,4°	5	73,3	71,4	77,1	71,7	74,2	2,4	1,3	1,0
72,6°/73,0°	5	75,3	72,4	82,4	73,0	74,9	4,1	1,9	3,9
72,2°/72,6°	5	77,3	73,2	85,1	73,6	78,8	4,9	1,2	1,1
Mayo Lat 6,2°									
73,0°/73,4°	6	72,0	68,2	77,5	68,6	74,7	3,6	0,6	-0,8
72,6°/73,0°	6	72,4	66,8	79,4	68,9	76,7	4,7	0,5	-1,0
72,2°/72,6°	6	75,2	70,8	82,4	72,9	78,1	4,3	1,1	0,5
Junio Lat 6,2°									
73,0°/73,4°	5	73,1	70,5	78,1	71,8	72,6	2,9	1,8	3,7
72,6°/73,0°	5	75,9	72,8	82,5	73,7	75,4	3,8	1,8	3,7
72,2°/72,6°	5	79,0	75,7	85,6	76,3	79,9	4,0	1,5	1,8

n: número de casos; $\overline{X}$: media aritmética; Min: valor mínimo; Max: valor máximo; ci: cuartil inferior; c_s: cuartil superior; S: desviación estándar; Sk: asimetría; K: índice de curtosis (apuntamiento)

a la ladera occidental de la Cordillera Oriental y a la frontera norte de la montaña santandereana y el oriente del cañón de los ríos Chicamocha y Suárez, que, como ya se dijo, es el sector con menor dispersión de *T. dimidiata*. Asimismo, se registró una situación inversa para las poblaciones localizadas en la porción nororiental del Magdalena Medio y en la región central del cañón, es decir, las áreas en las que los puntos de reporte de *T. dimidiata* aparecen más dispersos. Sin embargo, no se sabe qué tan significativas pueden ser estas diferencias, ya que incluso los valores mínimos obtenidos con los modelos utilizados clasificarían como de alta humedad relativa.

Discusión

Se observó que la T_{amb} en las áreas de muestreo osciló entre 28,3 y 33,9 °C. Según el sistema de Köppen (27), el clima de la región puede considerarse como macrotérmico. Las variables analizadas, más otras de tipo biótico, como la disponibilidad de hábitat y de fuentes de alimento, reflejaron condiciones estables que aumentan la probabilidad de una amplia dispersión de la especie y favorecen su mantenimiento y crecimiento.

Diversos autores (51-57) han señalado que es de esperar que los ciclos de vida sean más cortos a temperaturas constantes que oscilen entre 27 y 28 °C que aquellos de colonias mantenidas a temperaturas variables. En este sentido, los valores observados se mantuvieron en ese rango en mayo y junio, por lo menos durante los últimos cinco años del periodo de estudio, por lo cual cabe esperar que tales condiciones se hayan mantenido para las poblaciones de triatominos.

Estos resultados a nivel macroclimático aparentemente concuerdan con los obtenidos en el laboratorio por diversos autores para diferentes especies de triatominos. En esas condiciones, la duración media del ciclo de vida a 25 °C siempre ha sido mayor que a 30 °C (55,57-60). Con respecto a *T. dimidiata*, Zeledón, *et al*. (58), reportaron que los huevos incubados a temperaturas de 22 a 24 °C necesitaron un lapso más largo para eclosionar (29 días) que los incubados a 26 °C (23 días).

No obstante, los resultados obtenidos para las variables de temperatura (T_{2m}, T_{ms} y T_{sc}) indican que, según lo han sugerido varios autores, en realidad las condiciones distaron de ser las más favorables para los triatominos (18-28). Por ejemplo, en el área con más registros de *T. dimidiata*, la T_{ms} osciló entre 14,57 y 18,78 °C en mayo, y entre 14,37 y 15,55 °C en junio, es decir, una diferencia en la T_{amb} de hasta 13,93 °C en los valores mínimos y de 15,2 °C en los

máximos. Es decir que, según los valores obtenidos en las variables T_{2m}, T_{ms} y T_{sc}, debe esperarse que los ciclos de vida de las poblaciones de *T. dimidata* estudiadas fueran largos, a pesar de que los valores de la temperatura ambiente sugieran lo contrario. De verificarse esto, debe aceptarse que la T_{2m}, la T_{ms} y la T_{sc} serían variables más apropiadas que la T_{amb} para conocer las condiciones de temperatura *in situ* que soportan los triatominos.

Dichos resultados explicarían por qué varios autores han afirmado que los límites de temperatura superior e inferior soportables para la supervivencia de colonias de triatominos en condiciones naturales es relativamente amplio. Por ejemplo, para *T. infestans*, estos límites se encuentran entre los 10 y los 37 °C (53) y, para las especies argentinas, el mínimo necesario para su alimentación, su dispersión y su reproducción es de 20 °C (22,59). Así las cosas, es probable que estos valores no reflejen lo que ocurre con las poblaciones de triatominos en condiciones naturales.

Por ejemplo, Lorenzo, *et al.* (60), hallaron que, en condiciones de laboratorio, *T. infestans* prefiere refugios a una temperatura de 34 °C. Sin embargo, estos mismos autores sugieren que, bajo condiciones climáticas naturales, algunos tipos de domicilio serían refugios favorables para esta especie debido a que ofrecen las condiciones climáticas adecuadas y estables, pues sirven de amortiguador frente a las fluctuaciones entre las temperaturas mínimas y máximas.

Curto de Casas, *et al*. (22), sugieren que el factor climático importante es el número de días con temperaturas superiores a 20 °C y no tanto la temperatura más baja, como se suponía. Sin embargo, de incluirse las variables T_{2m}, T_{ms} y T_{sc}, se esperaría que fuera más importante el número de días con temperatura estable, aunque no necesariamente superior a 20 °C. Debe resaltarse que la mayoría de los autores hacen referencia a condiciones de laboratorio o temperatura ambiente (25,26), por lo que en este estudio, las observaciones de la T_{2m}, la T_{ms} y la T_{sc} se postulan como inéditas, por lo menos en lo que se refiere a *T. dimidiata*. Dado que son variables de resolución principalmente vertical, y teniendo en cuenta que en los triatominos no predomina el hábito del vuelo, se sugiere que estas son más adecuadas para entender el entorno ecológico de esta especie.

Por definición, la T_{ms} depende de la cantidad de radiación neta, lo cual resulta del equilibrio energético entre ondas cortas y ondas largas, y depende de factores extrínsecos, como la radiación global disponible, el albedo y el balance resultante de la radiación infrarroja. A su vez, esta última depende de la temperatura ambiente y de la capacidad de emisión de la atmósfera y la tierra (61).

Como se mencionó en la sección de resultados, los valores más bajos de T_{ms} se presentaron en las áreas donde más se reportó la presencia de *T. dimidiata* (con temperaturas entre los 14,6 y los 18,8 °C en mayo, y entre los 14,4 y los 15,6 °C en junio), lo cual respalda las deducciones sobre las condiciones ecológicas y ambientales locales que, ligadas a las macroclimáticas, incentivan la domiciliación. Sin embargo, por sí solo, esto no necesariamente significa que con valores máximos de temperatura en la superficie del suelo se deba descartar la presencia de triatominos en esas zonas. Hay que recordar que en los puntos de recolección en esta franja latitudinal y longitudinal se encontraron ejemplares de *T. dimidiata* domiciliados, por lo que, aparentemente, la mayor concentración del vector en las áreas cuya superficie del suelo es más fría coincide con la inferencia hecha con la variable anterior (T_{2m}). En otras palabras, los resultados sugieren que una temperatura más baja a nivel de la superficie del suelo, al igual que la T_{2m}, incentiva al vector a buscar refugios (que ya de por sí han sido sustituidos por los artificiales, con temperaturas más cálidas y estables), y una fuente de alimento de menor costo energético.

El significado ecológico de la T_{2m} para los triatominos es algo incierto. En regiones boreales, algunos autores equiparan la T_{2m} como la temperatura en el dosel (51), pero en las regiones tropicales no hay información exacta en este sentido. La estructura y la función de la T_{2m} dependen de los contrastes en las propiedades de la superficie del suelo (por ejemplo, entre tierra y mar), del relieve, la elevación altitudinal (62) y la posición latitudinal. Con respecto a esta variable, y con base en un muestreo realizado en diversos lugares de Suramérica, Pereira, *et al*. (63), encontraron que la sustitución de áreas con vegetación arbórea y otros tipos de uso del suelo puede acarrear un aumento de hasta 2 °C en la T_{2m}.

Como ya se mencionó, normalmente se espera que el vector se localice más a nivel del suelo, entre cuevas y rocas, pero también en oquedades y nidos de vertebrados, los cuales pueden perfectamente encontrarse a esta altura del suelo, aunque dichos refugios les permiten evitar la exposición al ambiente externo. Esto sugeriría,

por lo menos, tres posibilidades: primero, la T_{2m} en esta región puede estar restringiendo el nicho de estas poblaciones a ecótopos más a nivel de suelo, donde la temperatura es más alta; segundo, el vector bien puede ocupar ecótopos ya mencionados a esta altura del suelo, donde las condiciones microclimáticas son más favorables, es decir, la temperatura es mayor a la externa, y tercero, una combinación de las dos posibilidades anteriores, lo que resulta más probable.

Desde el punto de vista epidemiológico, cualquiera de estas situaciones puede aparecer cuando se le suman los problemas de deforestación en la región. La transformación del espacio no solo incluye la desaparición de la vegetación nativa, también implica la aparición de nuevos ecótopos que pueden cumplir igual función, o mejor, que los originales, pues las condiciones macroclimáticas extremas a este nivel del suelo ya no tienen un papel importante para la regulación de las poblaciones locales de *T. dimidiata*, pues este lo cumplen las viviendas humanas y la infraestructura creada para las actividades económicas o de sustento, como gallineros, marraneras, etc., que se pueden considerar como ecótopos artificiales, equivalentes desde el punto de vista funcional a los refugios naturales.

Curto de Casas, *et al.* (22), también sugieren que, desde el punto de vista macroclimático, una alta humedad del ambiente incrementa la distribución geográfica de especies tropicales y subtropicales propias de los bosques húmedos o inundables; por otro lado, una baja humedad disminuye la duración del ciclo de vida de especies propias de bosques secos tropicales y subtropicales y de áreas áridas, al tiempo que se incrementa su distribución geográfica y su densidad poblacional. Los resultados observados en este trabajo concuerdan con estas aseveraciones.

En este estudio se observó que la humedad relativa oscilaba entre 66,8 y 85,6 %. Lorenzo, *et al*. (60), encontraron que, en condiciones de laboratorio, *T. infestans* prefiere refugios con humedad relativa de alrededor de 20 %. Al igual que la temperatura en las viviendas, algunos materiales usados en la construcción de techos, como la jarilla (*Larrea* sp.), amortiguan las fluctuaciones entre los valores mínimos y máximos de humedad relativa.

Por otro lado, Xavier, *et al.* (64), sugieren que, en condiciones de laboratorio, los ejemplares de *T. brasiliensis* recién alimentados pueden buscar activamente áreas dentro de sus refugios donde la humedad relativa sea baja, con el objetivo de perder su exceso de agua sin costo metabólico, o adoptar un comportamiento opuesto en situaciones de estrés hídrico.

La humedad relativa observada en este estudio es la del ambiente en general, por lo que es posible que, a nivel microclimático, en realidad se presenten las condiciones observadas por los autores citados, y no las generales, tal y como se observó con las variables de temperatura.

En este sentido, las observaciones hechas en este trabajo sugieren que una alta humedad relativa genera en los ejemplares de *T. dimidiata* recién alimentados un comportamiento similar al encontrado en *T. brasiliensis*, es decir, la búsqueda y permanencia en refugios más secos y con temperaturas más bajas, lo que en la práctica convierte a los domicilios humanos en refugios inmejorables.

Por lo menos desde el punto de vista de los valores de temperatura y humedad relativa en las ecorregiones involucradas, se evidenció una relación inversa entre las dos variables, lo cual puede ser suficiente para desencadenar procesos biológicos y de comportamiento en los triatominos que impliquen una variación en el riesgo de infestación de las zonas pobladas.

En cuanto a la densidad de la cobertura vegetal, se evidenció que los valores de EVI2 observados en los sitios de muestreo en Boyacá correspondían a áreas cuya cobertura vegetal se ha visto muy afectada por intervenciones externas, transformándolos en áreas más simplificadas y menos densas, en comparación con los lugares de muestreo en Santander. Ello sugiere que la domiciliación de *T. dimidiata* no ocurre obligadamente cuando aún existe en las proximidades una cobertura vegetal natural y los ecótopos correspondientes, y es un buen indicio de la capacidad de adaptación y la resiliencia de *T. dimidiata* frente a diversas condiciones ecológicas y ambientales, lo cual le permite desenvolverse en biotopos simplificados y muy antrópicos (figura 4a), así como en aquellos ubicados en lugares con cobertura vegetal densa (figura 4b).

Sin embargo, esto no necesariamente significa que las áreas con vegetación menos densa favorezcan las poblaciones de *T. dimidiata*. Debe considerarse que, en cierta forma, los triatominos selváticos pueden estar espacialmente más dispersos, lo que en términos biológicos resulta en una disminución

de la probabilidad de cruces consanguíneos. Además, es posible que *T. dimidiata* mantenga su condición selvática en áreas que, de hecho, no tienen una estación seca bien definida, lo cual ya se ha evidenciado en especies como *Panstrongylus megistus* y *T. sordida* en el hemisferio sur (65), y en *Rhodnius prolixus* en el río Orinoco (66).

La condición selvática favorece la heterozigosis, aun cuando, en general, se acepta que los miembros de esta subfamilia son gregarios y en términos de la ecología de las poblaciones se habla de su dispersión o emigración cuando las colonias son muy densas y logran afectar e irritar a los huéspedes, aumentando la competencia entre ellas.

En términos biológicos, la subsecuente concentración de la población en los domicilios sugiere un aumento de la probabilidad de cruces endogámicos, es decir, un favorecimiento de la homozigosis, lo que puede significar, a largo plazo, un deterioro en la capacidad de reacción del vector a condiciones adversas. Desde este punto de vista, habría que preguntarse si la domiciliación de *T. dimidiata* en la zona puede deberse realmente a una preferencia de hábitat de la especie, o es la manifestación de una reducción del hábitat natural disponible para sus poblaciones.

Desde el punto de vista epidemiológico, las consecuencias son otras. Obviamente, una mayor disponibilidad de vectores en espacios reducidos, como es el caso de los insectos domiciliados, implica una mayor probabilidad de difusión de *T. cruzi* en la población y, por ende, una mayor probabilidad de transmisión de la enfermedad a los humanos que conviven con el vector.

Con base en el análisis de las series temporales, se concluyó que durante el tiempo de muestreo, poco más de diez años, la tendencia bienal tuvo mayor dominancia que la anual en el marco de la tendencia general del periodo dominante.

Desde el punto de vista de los patrones anual y bienal de la pluviosidad, si se acepta que una alta humedad del ambiente incrementa la distribución geográfica de las especies tropicales y subtropicales de los bosques húmedos, podría esperarse que en noviembre de cada año se produzca un aumento en la distribución de los ejemplares de *T. dimidiata* no domiciliados, y que en el período bienal este aumento se presente en el mes de agosto de los años pares. Estos hallazgos pueden servir para focalizar los periodos de vigilancia entomológica en la región.

En relación con la densidad de la cobertura vegetal, su aumento en mayo prodría favorer las poblaciones de vectores en relación con las condiciones bioclimáticas relacionadas, por ejemplo, la temperatura a nivel del suelo, aun cuando no tanto en términos de humedad del ambiente.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis muy compleja que representa una grave amenaza para la salud pública. En ausencia de una vacuna y de un adecuado tratamiento médico, además de la subvaloración de la magnitud de la enfermedad (se estima que más de 70 % de los pacientes infectados no son diagnosticados), los principales mecanismos para su control y eliminación deben basarse en medidas preventivas. La estrategia que ha demostrado mayor efectividad en la lucha contra la enfermedad de Chagas es el control vectorial, con el cual se pretende reducir el número de insectos antropofílicos mediante el uso específico, controlado y efectivo de insecticidas en las viviendas. Sin embargo, estas medidas de interrupción vertical solo han sido efectivas en zonas donde los insectos vectores se encuentran domiciliados, aunque se han reportado nuevas colonizaciones recurrentemente. En Colombia cada vez se reportan más triatominos y mamíferos intrusos en las viviendas, y recientemente se han presentado brotes de enfermedad aguda relacionada con dicha intrusión. En este sentido, se sugiere que las estrategias de control vectorial empleadas actualmente sean diseñadas y ejecutadas de manera local y se ajusten a las características biológicas de las especies de triatominos y las condiciones epidemiológicas en cada caso, por lo cual, para las poblaciones secundarias e intrusas de vectores, las alternativas que han mostrado mayor efectividad para el control demandan un conocimiento cabal de estas características.

En el esquema clásico de manejo y control de la enfermedad, el significado ecológico y biológico de la domiciliación no ha recibido la debida atención hasta ahora; en este estudio se sugiere que esta es adversa a largo plazo para las poblaciones de vectores. Este punto de vista permite un nuevo enfoque del problema epidemiológico, el cual ya se ha tenido en cuenta para el control químico, pues se evidenció que, debido a la homogeneidad genética de la especie, han sido pocos los hallazgos de resistencia a insecticidas.

Hasta hoy, los programas de control y manejo de la enfermedad se han enfocado en medidas contingentes basadas, sobre todo, en la eliminación del

vector domiciliado; sin embargo, estos programas no han podido impedir nuevas infestaciones del vector selvático.

En el marco del enfoque ecoepidemiológico del problema, se sugiere adoptar medidas contingentes y preventivas contra el vector no domiciliado, pues su presencia entraña nuevas posibilidades de transmisión que deben abordarse de manera diferente, sobre todo en el entendido de que los ciclos de rociado con insecticidas piretroides no logran evitar las nuevas infestaciones. Este, que es el método actual, aparentemente preventivo, en realidad es evidentemente contingente y, por ende, puede cuestionarse su efectividad para disminuir el riesgo de nuevas infestaciones de vectores selváticos.

En todo caso, desde una perspectiva ecológica resulta difícil garantizar la erradicación real y permanente del vector si no se avanza en el conocimiento del vector no domiciliado y, por supuesto, en el diseño de estrategias para su control.

Por último, hay suficiente información que permitiría el modelado y la proyección de la distribución de los triatominos, y de *T. dimidiata* en particular. Los modelos propuestos por diversas universidades, disponibles en los portales del IPCC, permitirían, una vez ajustados a las políticas de estado, obtener un panorama fiable del futuro de la situación de los vectores y del contexto epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Colombia.

Agradecimientos

A la Red Chagas Colombia y a Skandha EIT.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses con respecto al contenido del artículo.

Financiación

Colciencias, proyecto 3256-04-18067, y Red Chagas Colombia-Colciencias, proyecto 3256-04-18067, contrato 380 de 2011.

Referencias

1. **Dumonteil E, Gourbière S, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix, Ruiz-Piña H, Baños-López O, *et al*.** Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatán peninsula of México. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:176-83. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.176
2. **Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D.** Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae:Triatominae) en Colombia. Biomédica. 2007;27:143-62. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.258
3. **Calderón CI, Dorn PL, Melgar S, Chávez JJ, Rodas A, Rosales R, *et al*.** A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction. J Med Entomol. 2004;41:882-7. https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.882
4. **Schofield CJ.** Evolución y control del *Triatoma dimidiata*. En: Organización Panamericana de la Salud, editor. Taller para el establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*. (Documento OPS/HCP/HCT/214/02). San Salvador: Organización Panamerica de la Salud; 2002. p. 12-8.
5. **Dorn PL, Monroy C, Curtis A.** *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. Infect Gen Evol. 2007;7:343-52. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.10.001
6. **Blandón-Naranjo M, Zuriaga MA, Azofeifa G, Zeledón R, Bargues MD.** Molecular evidence of intraspecific variability in different habitat-related populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Costa Rica. Parasitol Res. 2010;106:895-905. https://doi.org/10.1007/s00436-010-1762-9
7. **Bargues MD, Klisiowicz DR, González-Candelas F, Ramsey JM, Monroy C, Ponce C, *et al*.** Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. PLoS Negl Trop Dis. 2008;7;2:e233. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000233
8. **Monroy MC, Bustamante DM, Rodas AG, Enríquez ME, Rosales RG.** Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Petén, Guatemala. J Med Entomol. 2003;40:800-6.
9. **Dorn PL, Calderón C, Melgar S, Moguel B, Solórzano E, Dumonteil E, *et al*.** Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and México. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3:e393. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000393
10. **Gómez-Palacio A, Triana O, Jaramillo-ON, Dotson EM, Marcet PL.** Eco-geographical differentiation among Colombian populations of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). Infect Genet Evol. 2013;20:352-61. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.003
11. **Gaunt M, Miles M.** The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:557-65. https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400019
12. **Parra-Henao G.** *Triatoma dimidiata* en Colombia. Distribución, ecología, análisis de factores de riesgo y generación de mapas predictivos de riesgo (tesis). Medellín: Universidad de Antioquia; 2012.
13. **Miles M, De Souza A, Povoa M.** Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Para State, Brazil. J Med Entomol. 1981;18:266-78.
14. **Noireau F, Carbajal-deLaFuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L.** Some considerations about the ecology of Triatominae. An Acad Bras Cienc. 2005;77:431-6. https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300006

15. **Parra-Henao G, Angulo V, Jaramillo N, Restrepo IM.** Triatominos (Hemiptera: Reduviidae) de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia: aspectos epidemiológicos, entomológicos y de distribución. CES Med. 2009;23:17-26.

16. **Quiroz-Gómez O, Jaramillo N, Angulo VM, Parra-Henao G.** *Triatoma dimidiata* en Colombia: distribucion, ecología e importancia epidemiológica. Biomédica. 2017;37:274-85. https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.2893

17. **Zeledón R, Montenegro VM, Zeledón O.** Evidence of colonization of man-made ecotopes by *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) in Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:659-60. https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000500012

18. **Carcavallo RU.** Climatic factors related to Chagas disease transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:367-9. https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700071

19. **Dumonteil E, Gourbière S.** Predicción de la abundancia y tasa de infección de *Triatoma dimidiata*: un mapa de riesgo de transmisión natural de la enfermedad de Chagas en la Península de Yucatán, México. Rev Biomed. 2004;15: 221-31.

20. **Hack W.** Estudios sobre biología del *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). An Inst Med Regional. 1955;4:125-47.

21. **Carcavallo RU.** Aspects of the epidemiology of Chagas disease in Venezuela and Argentina. En: New approaches in American Trypanosomiasis Research. Scientific publication 318. Washington, D.C.: OPS; 1976. p. 318-20.

22. **Curto de Casas S, Carcavallo R, Mena Segura C, Galíndez-Girón I, Burgos J.** Bioclimatic factors of Triatominae distribution. Useful techniques for studies on climatic change. Entomol Vect. 1994;1:51-68.

23. **Forattini O, Santos J, Ferreira O.** Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XVI. Dispersão e ciclos anuais de colônias de *Triatoma sordida* e de *Panstrongylus megistus* espontaneamente desenvolvidas em ecótopos artificiais. Rev Saúde Pública. 1979;13:299-313. https://doi.org/10.1590/S0034-8910197900040000

24. **Forattini OP, Ferreira OA, da Rocha e Silva EO, Rabello EX.** Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana: XIV - Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. Rev Saúde Pública. 1979;13:123-46.

25. **IPCC.** Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press; 2013.

26. **Mendonça F, Danni-Oliveira IM.** Climatologia: noções básicas e climas do Brasil. São Paulo: Oficina de Textos; 2007.

27. **Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F.** World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. Meteorologische Zeitschrift. 2006;15:259-63. https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130

28. **Parra-Henao G.** Sistemas de información geográfica y sensores remotos. Aplicaciones en enfermedades transmitidas por vectores. CES Med. 2010;24:75-90.

29. **Hernández J, Núñez I, Bacigalupo A, Cattan PE.** Modeling the spatial distribution of Chagas disease vectors using environmental variables and people's knowledge. Int J Health Geogr. 2013;12:29. https://doi.org/10.1186/1476-072X-12-29

30. **Pfeiffer D, Hugh-Jones M.** Geographical information systems as a tool in epidemiological assessment and wildlife disease management. Rev Scient Tech. 2002;21:91-102.

31. **Young SG, Tullis JA, Cothren J.** A remote sensing and GIS-assisted landscape epidemiology approach to West Nile virus. Applied Geography. 2013;45:241-9. https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2013.09.022

32. **Rytkönen MJ.** Not all maps are equal: GIS and spatial analysis in epidemiology. Int J Circumpolar Health. 2004; 63:9-24.

33. **Graham AJ, Atkinson PM, Danson FM.** Spatial analysis for epidemiology. Acta Trop. 2004;91:219-25. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.05.001

34. **National Research Council (US) Committee on Environmental Epidemiology.** Environmental Epidemiology: Volume 1: Public Health and Hazardous Wastes Washington, D.C.: National Academies Press (US); 1991. p. 1-20.

35. **Lai P-C, So F-M, Chan K-W.** Spatial epidemiological approaches in disease mapping and analysis. Int J Health Geogr. 2009;8:14. https://doi.org/10.1186/1476-072X-8-14

36. **Pfeiffer D, Robinson TP, Stevenson M, Stevens KB, Rogers DJ, Clements AC.** Spatial analysis in epidemiology. New York (NY): Oxford University Press; 2008. p. 142. https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-23

37. **Mateo RG, Felicísimo ÁM, Muñoz J.** Modelos de distribución de especies: una revisión sintética. Rev Chil Hist Nat. 2011;84:217-40. https://doi.org/10.4067/S0716-078X2011000200008

38. **Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, *et al*.** Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. Ecography. 2006;29: 129-51. https://doi.org/10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x

39. **Elliott P, Wartenberg D.** Spatial epidemiology: Current approaches and future challenges. Environ Health Perspect. 2004;112:998-1006. https://doi.org/10.1289/ehp.6735

40. **Emmanuel NN, Loha N, Okolo MO, Ikenna OK.** Landscape epidemiology: An emerging perspective in the mapping and modelling of disease and disease risk factors. Asian Pac J Trop Dis. 2011;1:247-50. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(11)60041-8

41. **Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. Ecol Model. 2006;190:231-59. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026

42. **Bloomfield P.** Fourier analysis of time series: An introduction. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.

43. **De Castro Victoria D, Andrade RG, da Paz AR.** Série temporal de imagens EVI/MODIS para discriminação de formações vegetais do Pantanal. Geografia. 2011;34:721-9.

44. **Jakubauskas ME, Legates DR, Kastens JH.** Harmonic analysis of time-series AVHRR NDVI data. Photogrammetric Engineering and Remote Sensing. 2001;67:461-70.

45. **Grupo Intergubernamental de Expertos sobre Cambio Climático.** Informe especial del IPCC, escenarios de emisiones. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2016. Disponible en: https://www.ipcc.ch/pdf/special-reports/spm/sres-sp.pdf.

46. **Gordon C, Cooper C, Senior CA, Banks H, Gregory JM, Johns TC, *et al*.** The simulation of SST, sea ice extents and ocean heat transports in a version of the Hadley Centre coupled model without flux adjustments. Climate Dynamics. 2000;16:147-68. https://doi.org/10.1007/s003820050010

47. **Jiang Z, Huete AR, Didan K, Miura T.** Development of a two-band enhanced vegetation index without a blue band. Remote Sens Environ. 2008;112:3833-45. https://doi.org/10.1016/j.rse.2008.06.006

48. **Jesus PH, Rocha JC.** Análise comparativa dos índices de vegetação NDVI e EVI2 na identificação de culturas de cana-de-açúcar em imagens Landsat-5. An Cong de Inic Cien. 2011;7:1-5.

49. **Hsu HP, Ranjan R.** Signals and systems. New York: McGraw-Hill; 2014.

50. **Galvão C, da Silva Rocha D, Cunha V, Presgrave OA, Jurberg J, Carcavallo R.** Influence of the temperature in the life cycle of *Triatoma melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:851-4. https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000600027

51. **De Roy W, De Vries H.** High resolution limited area model (HIRLAM). Harmonie verification and evaluation. Hirlam Technical Report. 2017;70:1-84.

52. **Garcia da Silva I, Garcia da Silva HH.** The influence of temperature on the biology of triatominae: IX. Rhodnius nasutus Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:377-82. https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000300013

53. **Carcavallo RU, Martínez A.** Life cycles of some species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). Can Entomol. 1972; 104:699-704.

54. **Rocha DS, Jurberga J, Carcavallo RU, Presgraveb OA, Cunhaa V, Galvãoa C.** Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. Rev Saúde Pública. 2001;35:400-6. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102001000400011

55. **Garcia da Silva I, Fernandes FF, Garcia da Silva HH.** Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. XX. Triatoma maculata (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). Rev Pat Trop. 1995;24:49-54.

56. **Garcia da Silva I, Garcia da Silva HH.** Influência da temperatura na biologia de Triatomíneos. III. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). Rev Bras Entomol. 1988;37:489-96.

57. **Garcia da Silva I, Garcia da Silva HH.** The influence of temperature on the biology of triatomine. IX. *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:377-82. https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000300013

58. **Zeledón R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelder JC.** Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. J Med Entomol. 1970;7:313-9.

59. **Curto de Casas S, Carcavallo R.** Límites del triatomismo en la Argentina. I: Patagonia. Chagas. 1984;1:35-40.

60. **Lorenzo MG, Lazzari CR.** Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. Acta Trop. 1999;72:241-9. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00094-1

61. **Li Z-L, Tang B-H, Wu H, Ren H, Yan G, Wan Z, *et al*.** Satellite-derived land surface temperature: Current status and perspectives. Remote Sens Environ. 2013;131:14-37. https://doi.org/10.1016/j.rse.2012.12.008

62. **Sattler K, Huang XY.** Structure function characteristics for 2 meter temperature and relative humidity in different horizontal resolutions. Tellus. 2002;54:14-33. https://doi.org/10.1034/j.1600-0870.2002.00281.x

63. **Pereira G, Silva MES, Moraes EC.** O uso de produtos orbitais para a parametrização de processos físicos em modelos numéricos regionais e suas alterações climatológicas. Rev Bras Clim. 2012;11:7-24.

64. **Xavier AAP, Lorenzo MG, Lazzari C, Diotaiuti L, Guarneri AA.** Relative humidity and water loss in *Triatoma brasiliensis*. Physiolog Entomol. 2005;30:338-42. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2005.00467.x

65. **Forattini OP, Ferreira OA, da Rocha e Silva EO, Rabello EX.** Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana: XII - Variação regional da tendência de *Panstrongylus megistus* à domiciliação. Rev Saúde Pública. 1978;12:209-33. https://doi.org/10.1590/S0034-89101978000200013.

66. **Gómez-Núñez J.** Notas sobre la ecología del *Rhodnius prolixus*. Bol Malar San Amb. 1963;3:330-5.

Biomédica 2017;37(Supl.2):124-34
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3492

ARTÍCULO ORIGINAL

Anopheles darlingi Root 1926 (Diptera: Culicidae): variaciones morfométricas en alas y patas de poblaciones de Colombia

Miguel Alfonso Pacheco[1], Ranulfo González[2], Helena Luisa Brochero[1]

[1] Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introducción. Las poblaciones naturales de *Anopheles darlingi*, principal transmisor de la malaria en Colombia, han mostrado plasticidad fenotípica en algunos de sus caracteres diagnósticos.
Objetivo. Caracterizar las variaciones morfométricas de los patrones alares y de la pata posterior en poblaciones naturales de *An. darlingi* recolectados en localidades colombianas donde la malaria es endémica.
Materiales y métodos. Se analizaron los patrones de manchas de la vena costal del ala de hembras silvestres recolectadas en los departamentos de Chocó, Guaviare, Meta y Vichada mediante morfometría lineal y geométrica. El segundo tarsómero posterior de las hembras se analizó mediante morfometría lineal.
Resultados. Se encontraron 19 patrones de manchas de la vena costal. Los patrones I, con 49 % (n=118/240) y VI, con 28 % (n=66), fueron los más frecuentes. La proporción del área oscura basal (DS-III$_2$) y del tarsómero posterior (Ta-III$_2$) constituyó una característica sólida de diagnóstico, pues representó el 89 % (n=213/240) del total de especímenes analizados. Se encontraron diferencias significativas en la forma (F=1,65; gl=50; p<0,001) y el tamaño (F=3,37; gl=5; p=0,005) del ala entre las poblaciones de diferentes localidades. El centroide de menor tamaño (2,64 mm) se encontró en las poblaciones de Chocó.
Conclusiones. Se registraron 11 patrones nuevos para las manchas de la vena costal y se confirmó la dominancia de los patrones alares I y VI en las poblaciones de *An. darlingi* de Colombia, así como la relación de DS-III$_2$ y Ta-III$_2$ como un rasgo sólido de diagnóstico para la taxonomía de la especie. Se encontraron diferencias en el tamaño corporal de las poblaciones evaluadas, lo cual reviste importancia para el análisis de aspectos bionómicos de la especie.

Palabras clave: *Anopheles*; vectores de enfermedades; tamaño corporal; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3492

***Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Rood 1926: Morphometric variations in wings and legs of populations from Colombia**

Introduction: Natural populations of *Anopheles darlingi*, the main malaria vector in Colombia, have shown phenotypic variations in some of their diagnostic characters.
Objective: To characterize morphometric variations in wing spot patterns and diagnostic characters of the hind leg of adult females of *An. darlingi* collected in areas where malaria is endemic.
Materials and methods: Patterns of the costal vein spots of wild females of *An. darling* populations collected in the departments of Chocó, Guaviare, Meta and Vichada were analyzed using linear and morphometric approaches. The second tarsomere of the hind leg of females was characterized by linear morphometric analysis.
Results: We found 19 patterns of spots in the costal vein; patterns I (n=118/240, 49%) and VI (n=66, 28%) were the most frequent. The proportion of the basal dark area of hind tarsomere II and the length of hind tarsomere II (DSIII$_2$/Ta-III$_2$) constituted a robust diagnostic character as it represented 89% (n=213/240) of the total specimens studied. Significant differences were found in the wing shape (F=1.65, df =50, p<0.001) and the wing size (F=3.37, df=5, p=0.005) among populations from different locations. The smallest centroid size (2.64 mm) was found in populations from Chocó.
Conclusions. We registered 11 new wing spot patterns in the costal vein and the dominance of the patterns I and VI for populations of *An. darlingi* from Colombia. We confirmed DSIII2/TaIII2 ratio as a

Contribución de los autores:
Miguel Pacheco: montaje de alas y patas, mediciones de los ejemplares por morfometría linear y geométrica, y análisis de resultados
Ranulfo González y Helena Brochero: coordinación del componente de morfometría linear y análisis de resultados
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

robust diagnostic character for the taxonomy of this species. We found differences between the size and shape of the wings of *An. darlingi* populations in accordance to their geographical distribution, which constitute important bionomic aspects for this malaria vector.

Key words: *Anopheles*; diseases vectors; body size; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3492

Anopheles darlingi Root, 1926, es considerado como el principal vector de la malaria, o paludismo, en Colombia (1-3). La distribución geográfica de la especie va desde el sur de México hasta el norte de Argentina (4-7). La especie pertenece al subgénero *Nyssorhynchus*, sección Argyritarsis, cuyos individuos se caracterizan por presentar el V tarsómero de la pata posterior blanco, esternito abdominal I sin línea submedial de escamas claras y el quinto palpómero completamente claro. Las autopomorfias de la especie incluyen el mesanepimeron anterior con un grupo conspicuo de escamas claras, el mesanepimeron superior sin escamas claras y la mancha prehumeral oscura (*Prehumeral Dark Spot*, PHD), con una longitud entre tres y cuatro veces mayor que la de la mancha humeral clara (*Humeral Pale Spot*, HP) (4). No obstante, las poblaciones naturales de *An. darlingi* se caracterizan por presentar una importante variabilidad genética y morfológica (8-13) relevante tanto para la taxonomía de la especie como para los estudios de asociación de aspectos de su biología y su papel como vector.

Con base en las variaciones del grado de fusión de las manchas de la vena costal del ala, se han descrito ocho patrones alares en poblaciones de Venezuela y Colombia (14). Con respecto al tamaño del ala, se han encontrado cambios asociados a factores ambientales y ecológicos determinantes propios de las ecorregiones que ocupa la especie (15). El tamaño del ala ha sido un estimador indirecto del tamaño corporal en insectos de importancia médica (16). En anofelinos, las diferencias en el tamaño corporal constituyen un rasgo de gran importancia epidemiológica para la malaria. Se ha observado que la reserva de energía que requiere una hembra para la búsqueda de su fuente de alimentación con sangre depende de su tamaño corporal expresado en biomasa (17) y que las hembras pequeñas requieren más de una ingestión de sangre para completar su primer ciclo gonotrófico (16), lo cual puede incrementar la probabilidad de adquirir los parásitos de la malaria humana. La forma y la longitud del ala constituyen características que contribuyen a definir la eficacia del vuelo (17), rasgo fundamental para la búsqueda de sitios aptos para la oviposición, la búsqueda de fuentes de sangre (9), la dispersión de genes de resistencia a insecticidas (18) y la propagación de esporozoítos de *Plasmodium* spp. (17). Estos rasgos del ala no dependen solo del acervo genético (19), sino que se ven afectados por variables ambientales, como la temperatura, la humedad relativa y la altitud (20,21).

Los estudios de morfometría en anofelinos han permitido análisis que contribuyen a una mejor resolución taxonómica y a una mejor comprensión de las variaciones en la población de una especie y entre varias de ellas (20,22-25).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las variantes morfométricas de las características de las alas y de la pata posterior de poblaciones naturales de *An. darlingi* recolectados en seis localidades de cuatro departamentos de Colombia donde la malaria es endémica. Con este propósito, para cada espécimen de las poblaciones estudiadas se establecieron: a) los patrones alares según la presencia, ausencia o fusión de las manchas de la vena costal; b) la relación de la longitud de cada mancha de la vena con respecto a la longitud alar total; c) la relación de la longitud de la banda oscura del tarsómero posterior II con respecto a la longitud total del tarsomero, y d) se hicieron los análisis de morfometría lineal y geométrica para estimar el tamaño corporal de las poblaciones del insecto y los posibles cambios en la forma alar.

Materiales y métodos

Sitios de estudio

Los especímenes estudiados eran hembras silvestres recolectadas mediante exposición de humanos durante 50 minutos por hora entre las 18:00 y las 06:00 horas, en dos noches consecutivas de cada mes, tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio de las zonas geográficas donde la malaria es endémica (26-29). Las poblaciones de

Correspondencia:
Miguel A. Pacheco, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 35-03, edificio 500, laboratorio 221A, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: 316 5000,extensión 19115
mapachecog@unal.edu.co

Recibido: 12/08/16; aceptado: 27/07/17

estudio provenían de Pacurita (CHQP), municipio de Quibdó y Bete (CHQB) municipio de Medio Atrato, en el departamento del Chocó, ambos localizados al occidente de la cordillera Occidental (28). En el oriente de la cordillera Oriental, se incluyeron las localidades de Puerto Gaitán (MPG) en el departamento del Meta (28); San José del Guaviare (SJG) y Miraflores (GM) en el departamento del Guaviare (26,27) y Puerto Carreño (VPC) en el departamento del Vichada (29) (cuadro 1, figura 1).

Se analizaron 240 alas derechas en posición dorsal que exhibieran claramente las manchas de la vena costal y 240 patas posteriores que presentaran todos los tarsómeros. Cada pata y cada ala se colocaron en seco sobre láminas de vidrio, cubiertas luego con laminilla y selladas en los bordes con esmalte industrial o bálsamo de Canadá (figura 2, A y B).

Caracteres morfológicos considerados para los análisis

Alas. Se consideraron todas las manchas ubicadas en la vena costal según la nomenclatura vigente (14,30), así: basal clara y prehumeral clara (*basal pale*-BP + *prehumeral pale*-PHP), prehumeral oscura (*prehumeral dark*-PHD), humeral clara (*humeral pale*-HP) (31), humeral oscura (*humeral dark*-HD), presectorial clara (*presector pale*-PSP), presectorial oscura (*presector dark*-PSD), sectorial clara (*sector pale*-SP), sectorial proximal oscura (*proximal sector dark*-PRSD), accesoria clara (*accesory sector*-ASC), sectorial distal oscura (*distal sector dark*-DSD), subcostal clara (*subcostal pale*-SCP), preapical oscura (*preapical dark*-PD), preapical clara (*preapical pale*-PP), y apical oscura (*apical dark*-AD) (30,32,33). La longitud total del ala se midió desde el alulae hasta la intersección de la vena radial 3 con la margen alar (figura 2A).

Pata posterior. Se midió la longitud total del tarsómero II de la pata posterior ($Ta\text{-}III_2$) y su correspondiente área oscura ($DS\text{-}III_2$) (figura 2B).

Morfometría lineal. Se midieron todas las manchas de la vena costal de cada espécimen con 30 aumentos, en tanto que $Ta\text{-}III_2$ y $DS\text{-}III_2$ se midieron con 63 aumentos utilizando un estereomicroscopio Nikon 5MZ 800® con micrómetro ocular. Los datos obte-nidos se consignaron en milímetros en una base de datos de Excel®.

Con el propósito de obtener datos estandarizados de la longitud alar de cada mancha de la vena costal, las mediciones se transformaron mediante la siguiente ecuación (34):

$$P = \sqrt{Arcoseno\left[\sqrt{X/(LAT+1)}\right] + Arcoseno\left[\sqrt{(X+1)/(LAT+1)}\right]}, \quad [1]$$

donde *P* es la proporción transformada de la longitud de la mancha de la vena costal con respecto a la longitud total del ala, *X* es la longitud de la mancha en mm y LAT es la longitud del ala en mm.

En los análisis de morfometría lineal, solo se incluyeron los patrones alares I y VI (n=179) por ser los más frecuentes. Para comparar las medidas de las manchas, las longitudes de las manchas PSD, SP y PRSD del patrón I se sumaron, ya que en el patrón VI estas se encuentran fusionadas. En cada espécimen se midieron 10 manchas alares

Cuadro 1. Sitios de recolección de ejemplares adultos de *Anopheles darlingi* en siete localidades de Colombia

Departamento/ Municipio	Localidad	Coordenadas	Altitud (msnm)	Temperatura promedio anual (°C)	Humedad relativa promedio anual (%)	Precipitación media anual (mm)	Año de recolección	Especímenes analizados
Chocó								
Quibdó	Pacurita CHQP	5° 40′ 55,1″ N 76° 35′ 48,0″ O	32	26,5	90	7.883	2010	25
Medio Atrato	Beté CHQB	6° 0′ 11,2″ N 76° 46′ 51,1″ O	25	27,9	90	5.018	2002	15
Meta								
Puerto Gaitán	Puerto Gaitán MPG	4° 18′ 41,0″ N 72° 04′ 44,1″ O	149	26,1	81	2.183	2009	40
Guaviare								
San José del Guaviare	San José del Guaviare SJG	2° 34′ 26,2″ N 72° 38′ 32,3″ O	189	25,7	85	2.498	2009	40
Miraflores	Miraflores GM	1° 20′ 14,0″ N 71° 57′ 44,1″ O	200	26,5	85	3.150	2010	40
Vichada								
Puerto Carreño	Puerto Carreño VPC 09	6° 11′ 09,1″ N 67° 28′ 52,0″ O	51	28,2	70	2.166	2009	40
Puerto Carreño	Puerto Carreño VPC 12	6° 11′ 09,3″ N 67° 28′ 52,2″ O	51	28,2	70	2.166	2012	40

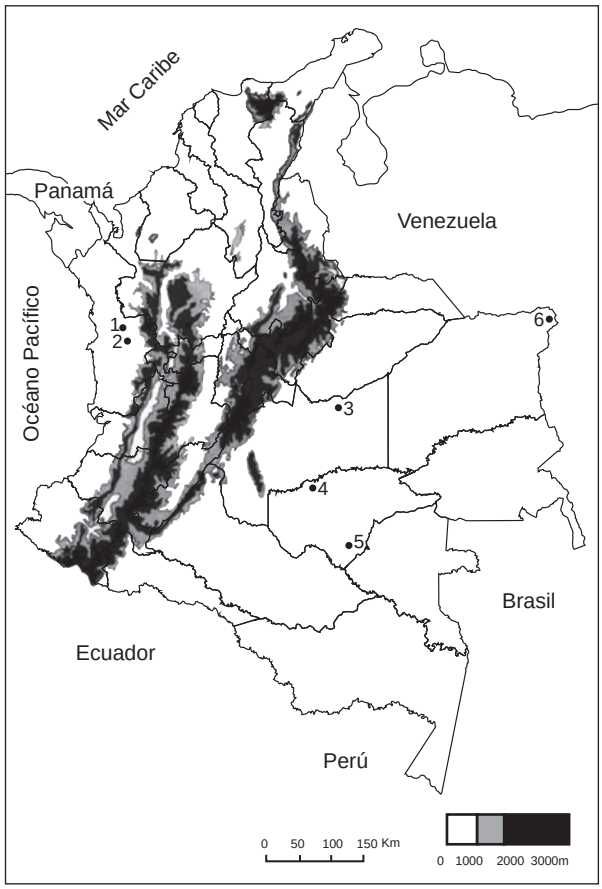


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de estudio de *Anopheles darlingi* en seis localidades de Colombia: Beté, Chocó (1); Pacurita, Chocó (2); Puerto Gaitán, Meta (3); San José del Guaviare, Guaviare (4); Miraflores, Guaviare (5); Puerto Carreño, Vichada 2009 y 2012 (6)

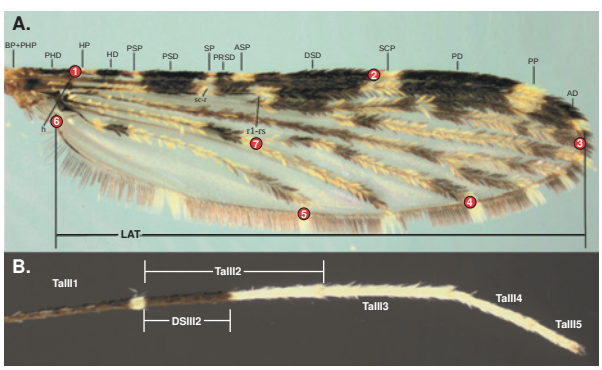


Figura 2. A. Patrón I, sin fusiones en el ala de *Anopheles darlingi*. Los puntos rojos señalan la ubicación de los puntos de referencia analizados: PR1, intersección de la vena humeral con la vena costal; PR2, intersección de la vena subcostal con la vena costal; PR3, intersección de la vena radial 3 con el margen alar; PR4, intersección de la vena cubital 1 con el margen alar; PR5, intersección de la vena anal con el margen alar; PR6, alula; PR7, intersección de la vena cubital anterior con la transversal m-cu. **B.** Tarsómeros de la pata posterior de *An. darlingi*

estandarizadas, tres proporciones de manchas (PHD/HP, DSD/SCP, $DSIII_2/TaIII_2$) y la longitud alar en milímetros.

Después de aplicar un test de normalidad de los datos (35), se hizo un análisis de varianza multivariado (ANDEVA) (36), con el objetivo de establecer diferencias significativas en las mediciones de estos caracteres entre poblaciones y por región, agrupando las poblaciones del occidente de la cordillera Occidental y las del oriente de la cordillera Oriental. Se utilizó la prueba de Hotelling (37) asumiendo un alfa de 0,05 para estimar el agrupamiento de los especímenes según su población de origen.

Se hizo un análisis de conglomerados basado en la similitud de las medias aritméticas de las variables evaluadas en cada población según el algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean,* UPGMA (38), y se seleccionó el dendrograma con el coeficiente de correlación cofenética más alto. Se hizo un análisis canónico *(Canonical Discriminant Analysis, CDA)* (39) para describir algebraicamente las relaciones entre dos o más localidades, de tal manera que las diferencias entre ellas se maximizaran o se hicieran evidentes (36). Se realizó análisis de varianza no paramétrica de la longitud alar, agrupando los datos por sitio de captura (intradomicilio o peridomicilio) y por población de origen. Se utilizó el programa estadístico RWizard (40).

Morfometría geométrica. Se organizó un banco de fotografías de las alas evaluadas (n=240) en posición dorsal con 30 aumentos y en la misma escala para todos los especímenes utilizando una cámara digital Nikon DS-2Mv® acoplada a un estereomicroscopio Nikon 5MZ 800®. Se seleccionaron siete puntos de referencia (41) (cinco de los cuales correspondieron al tipo I, es decir, hitos (*landmarks*) situados en intersecciones de dos de las curvas de las venas del ala), que permitieran el trazado de un polígono para cubrir el área total del ala, incluidas su longitud y su forma (figura 2A), las cuales se digitalizaron sobre cada imagen usando el programa TPSDig2 (42).

Se hizo un análisis de Procusto por población para obtener las variables asociadas a la forma (dos coordenadas de Procusto por cada punto de referencia, una en el eje X y otra en el eje Y) y al tamaño alar, definido como el tamaño del centroide correspondiente a la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas de cada punto de referencia con respecto al centroide del polígono.

Utilizando el programa MorphoJ (43), se aumentaron proporcionalmente las configuraciones de los puntos de referencia y se rotaron por superposición con respecto a la configuración de consenso (44). Con estos datos, se hizo un análisis discriminador que se graficó utilizando el programa estadístico RWizard (40).

Se obtuvo un dendrograma de los resultados relacionados con la forma y el tamaño alar a partir del análisis de similitud, según el algoritmo UPGMA con el programa InfoStat (45). Asimismo, se hizo análisis de varianza del tamaño del centroide por población de origen, para lo cual las poblaciones de Pacurita y Beté se agruparon como una sola, con el fin de incrementar el tamaño de la muestra de análisis y equilibrar las poblaciones consideradas. El efecto del tamaño sobre la forma del ala se evaluó mediante un análisis de regresión de las coordenadas de Procusto con respecto al tamaño del centroide, y su significación estadística se determinó con una prueba de 10.000 permutaciones (46) con el programa MorphoJ (43).

Todo el trabajo se llevó a cabo en el Área de Genética de Insectos de Interés Económico del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Consideraciones éticas

El proyecto *Malaria Vector Biology in Brazil*: *Ecology and Genetics*, en cuyo marco se recolectaron los mosquitos objeto del presente estudio (26-29), contó con la aprobación de los comités de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, de la *Institutional Review Board* del *New York State Department of Health* y de los *National Institutes of Health* de los Estados Unidos.

En la alimentación de los mosquitos se siguieron los protocolos de manejo de vertebrados de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y del Comité de Ética en cuidado animal de la *Office of Laboratory Animal Welfare* (Assurance N| A5791-01) de los *National Institutes of Health* y del *Institutional National Animal Care and Use Committee* del *New York State Department of Health*, según protocolo N° 11-420.

Resultados

Patrones alares

Se encontraron 19 patrones de manchas costales (figura 3). Puerto Carreño (Vichada, 2009) y Puerto Gaitán (Meta) presentaron la mayor diversidad, ambos con 10 patrones diferentes en sus poblaciones naturales de *An. darlingi*. El patrón alar I fue el más frecuente, con 49 % (n=118/240), seguido del patrón VI, con 28 % (n=66), excepto en Puerto Gaitán, en donde se encontraron 15 ejemplares con el patrón VI y 14 con el patrón I del total de 40 evaluados (cuadro 2).

Morfometría lineal

Con base en el rango de 3,00 a 4,00 propuesto para la relación de las manchas prehumeral oscura y humeral clara (PHD/HP) en poblaciones naturales de *An. darlingi* (4,47), se encontró que el 46 % (106/240) de los especímenes analizados estuvieron en este rango, exceptuando los individuos con patrones IX y XXII, en los cuales estas manchas se encuentran fusionadas. El 89 % (213/240) de los individuos analizados estuvo dentro del rango entre 0,35 y 0,55 para la proporción $DSIII_2/TaIII_2$, definida como uno de los caracteres diagnósticos para la especie (4,47).

Se encontraron diferencias significativas en las poblaciones entre la longitud de las manchas analizadas y la longitud alar (ecuación [1]) y las proporciones diagnósticas PHD/HP y $DS\text{-}III_2/Ta\text{-}III_2$ (F=4,90; gl=72,959; p<0,001) a partir del ANDEVA. Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones (H=25,76; gl=6; p>0,001) al comparar las medias de la longitud alar con el test de Kruskal-Wallis (48).

Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones en cuanto a la longitud de las manchas analizadas con respecto a la longitud de las alas: Miraflores (GM=2,95 mm), Puerto Gaitán (MPG=2,85 mm), San José del Guaviare (SJG=2,91 mm) y Puerto Carreño (VPC 09=2,89 mm; VPC 12=2,86 mm). Por el contrario, las dos poblaciones de Chocó presentaron, en promedio, menores longitudes alares (CHQP y CHQB=2,79 mm).

En general, se observaron diferencias significativas (H=13,44; gl=1; p<0,001) en el promedio del tamaño alar entre las poblaciones del occidente de la cordillera Occidental (2,79 mm) y las localizadas al oriente de la cordillera Oriental (2,89 mm). En las poblaciones del oriente, se observó una relación del tamaño alar con respecto a la latitud por gradiente geográfico, encontrándose alas más grandes hacia el sur (Miraflores, Guaviare) y en poblaciones del norte (Puerto Carreño, Vichada).

También, se encontraron diferencias significativas (H=4,27; gl=1; p=0,038) en el tamaño alar según el sitio de captura: en los mosquitos capturados

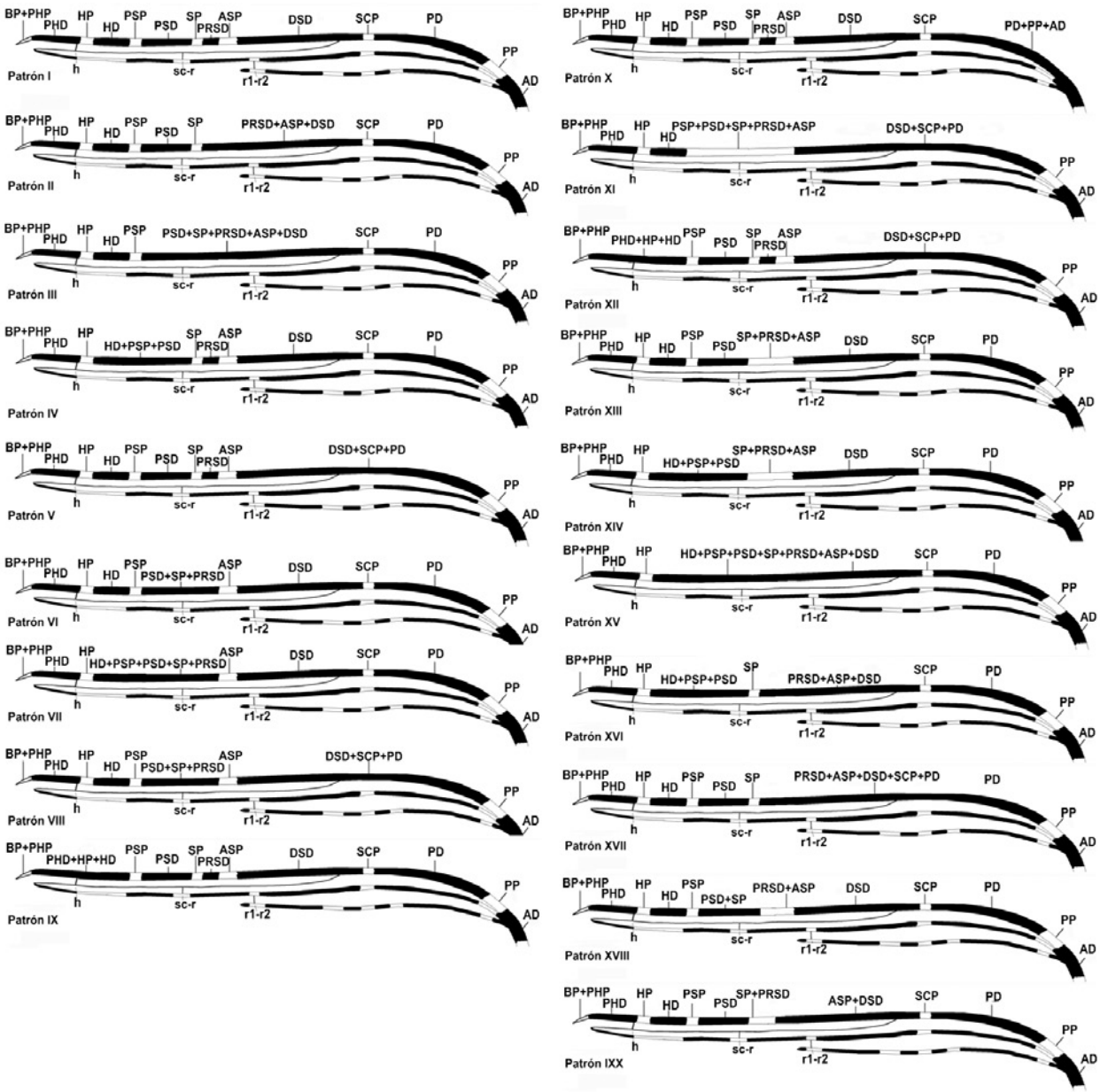


Figura 3. Patrones alares encontrados en poblaciones naturales de *Anopheles darlingi* de Colombia.

Cuadro 2. Frecuencias (%) de los patrones alares de las manchas de la vena costa en *Anopheles darlingi* de seis localidades de Colombia. Miraflores, Guaviare (GM); San José del Guaviare, Guaviare (SJG); Pacurita, Chocó (CHQP); Beté, Chocó (CHQP); Puerto Carreño, Vichada 2009 y 2012 (VPC); Puerto Gaitán, Meta (MPG)

		Frecuencia por patrón costal (%)																	
Población	**n**	**I**	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**	**IX**	**X**	**XI**	**XII**	**XIII**	**XIV**	**XV**	**XVI**	**XVII**	**XVIII**	**XIX**
GM	40	67		5	2,5		20	2,5						3						
SJG	40	45	7,5	2,5			38			2,5				2,5					2	
CHQP	15	36	7		7		23	13									7		7	
VPC 09	40	43	2,5	5	7,5	2,5	22	10		2,5						2,5		2,5		
CHQB	25	40			4		24	4	4		4	4		4	4				4	4
VPC 12	40	63	2,5	2,5	5		20	5						2						
MPG	40	35	2,5	5	2		38	5	5				2,5			2,5		2,5		
Total	240	49	2,9	3,1	3,8	0,4	28	5	1	0,8	0,4	0,4	0,4	1	0,4	0,8	0,4	0,8	1	0,4

mientras picaban en el intradomicilio (2,91 mm) eran más grandes que en los capturados en el peridomicilio (2,85 mm).

Morfometría geométrica

Se encontraron diferencias significativas en la forma alar (coordenadas de Procusto) (F=1,65; gl=50; p<0,001) y en el tamaño del centroide (F=3,37; gl=5; p=0,005) según la localidad de origen de los individuos analizados. Mediante morfometría geométrica, se confirmaron las diferencias (F=4,22; gl=1; p=0,041) en el tamaño corporal de los mosquitos capturados en el intradomicilio (2,70 mm) comparados con los recolectados en el peridomicilio (2,66 mm), tal como se observó en el análisis mediante morfometría lineal.

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las alas entre las regiones occidental y oriental (F=3,14; gl=1; p=0,077), las poblaciones de Chocó (2,64 mm) mantuvieron la tendencia a presentar mosquitos con alas más pequeñas que los de las poblaciones de la región oriental (2,68 mm). El análisis UPGMA (figura 4C) reveló una agrupación similar a la obtenida con los datos de morfometría lineal (figura 4A), aunque la población del Meta se asoció con las poblaciones de Vichada y no con las de Guaviare. Mediante el análisis discriminante (figura 4D), los especímenes se clasificaron nuevamente y de forma satisfactoria (72,43 %, 'reclasificación' primaria; 62,57 %, a través de 1.000 permutaciones) de acuerdo con su localidad de origen. La mayor variación en la forma alar en las poblaciones estudiadas, se encontró en las regiones cubital y anal del ala (figura 5).

Discusión

Se encontraron variantes morfológicas que representaban 19 patrones de manchas en la vena costal de poblaciones naturales de *An. darlingi* en Colombia, los cuales incluyeron los ocho registrados previamente (14). Aunque los patrones I y VI fueron los más frecuentes, pueden presentarse fusiones entre áreas claras y oscuras de la vena costal, con excepción de la mancha preapical clara. La frecuencia de patrones alares está en función de la representatividad muestral y geográfica (12,14)

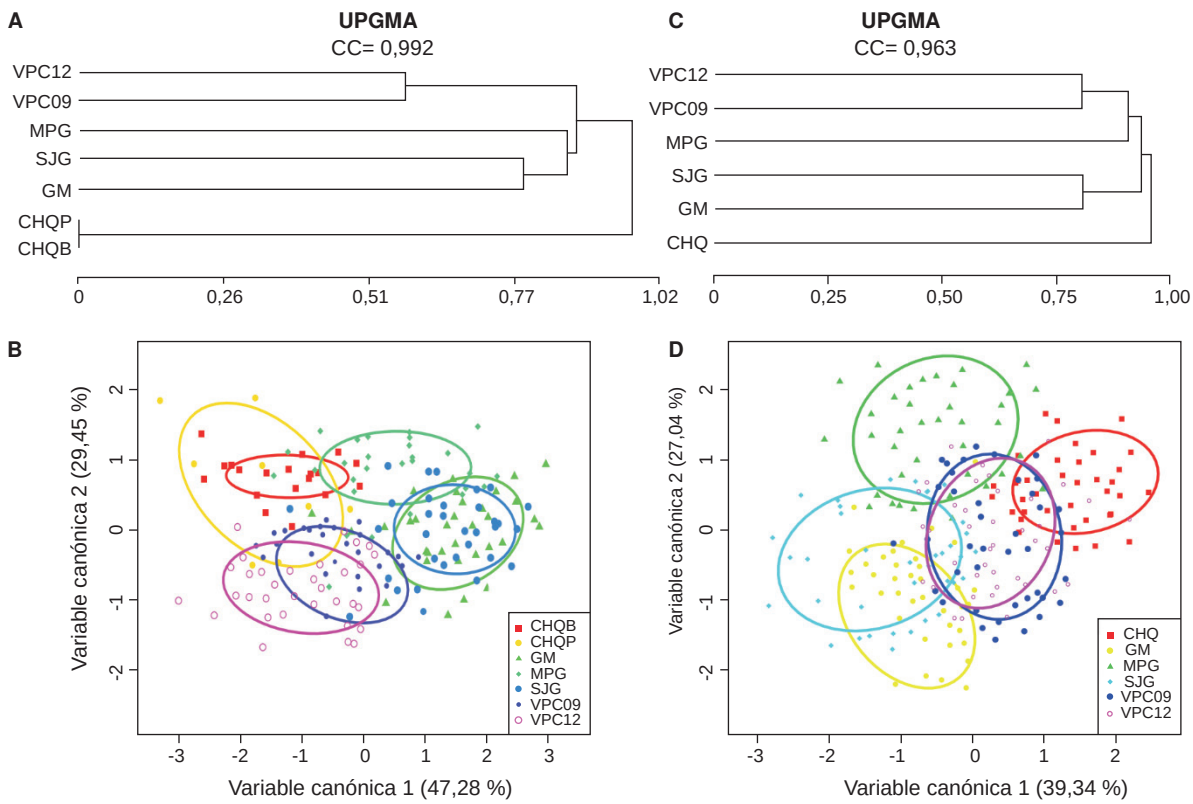


Figura 4. A) Análisis de conglomerados (UPGMA) mediante morfometría lineal. **B)** Análisis discriminador mediante morfometría lineal. **C)** Análisis de conglomerados (UPGMA) mediante morfometría geométrica. **D)** Análisis discriminador mediante morfometría geométrica. Miraflores, Guaviare (GM); San José del Guaviare, Guaviare (SJG); Pacurita, Chocó (CHQP); Beté, Chocó (CHQP); Puerto Carreño, Vichada 2009 y 2012 (VPC); Puerto Gaitán, Meta (MPG)

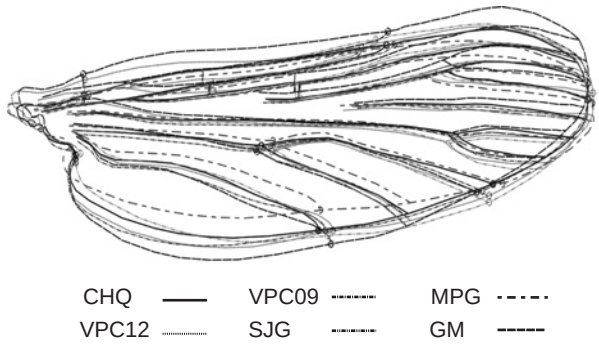


Figura 5. Variación en la forma alar de *Anopheles darlingi* en seis localidades de Colombia
CHQ: Quibdó; VPC09: Puerto Carreño, 2009; VPC12: Puerto Carreño, 2012; MPG: Puerto Gaitán; SJG: San José del Guaviare; GM: Miraflores

de los especímenes estudiados, pero se ha asociado de forma relevante con factores abióticos, particularmente durante su desarrollo embriológico.

En el presente trabajo, se registraron entre seis y diez patrones alares por localidad, pero resulta interesante el hecho de que se encontraron diferentes frecuencias de patrones alares en las muestras recolectadas en 2009 y 2012 en Puerto Carreño, Vichada. En 2009 hubo una clara influencia del fenómeno El Niño-Oscilación del Sur (ENSO), caracterizado por la disminución en la precipitación y los incrementos en la temperatura ambiental (49), en tanto que en 2011, se inició en el país el fenómeno de La Niña, el cual se extendió hasta el 2012, con un incremento significativo de las precipitaciones, aumento de la humedad relativa y disminución de la temperatura (50).

En Puerto Carreño, el incremento de las lluvias suele provocar el desbordamiento de los ríos Meta y Orinoco, lo que genera criaderos de gran extensión favorables para *An. darlingi,* en tanto que durante los periodos de escasa precipitación, los criaderos se encuentran fragmentados y en aguas de escorrentía que podrían tener un mayor contenido de materia orgánica y de minerales, también aptos para la especie. La exposición de los huevos y de las formas inmaduras a tales condiciones ambientales puede determinar las variaciones morfológicas de los patrones alares representados por las manchas de la vena costal. No obstante, estos hallazgos deben ser confirmados en estudios controlados de laboratorio para evaluar el efecto que podrían tener las diferentes variables, especialmente la temperatura, en la expresión de los caracteres fenotípicos de las manchas de la vena costal y el tamaño corporal.

A partir del agrupamiento basado en la morfometría lineal de las poblaciones de la región oriental, se observó un gradiente geográfico en el cual se evidenció una mayor diversidad de los patrones alares en la alta Orinoquia (VPC 09 y MPG) y una menor en Miraflores, Guaviare, localidad asociada a la Amazonia. Esta relación se mantuvo en cuanto al tamaño de las alas de la especie, con alas más grandes en la población de Vichada y más pequeñas en la población de Miraflores. Este gradiente latitudinal determina características ecológicas propias de la Orinoquia y su transición a la Amazonia con cambios en la vegetación, los vientos y las variables abióticas ambientales específicas que influyen en el desarrollo de la especie (51). Estas características, asociadas con la estacionalidad en el régimen de lluvias, determinan la aparición de criaderos con mayor influencia antrópica unos que otros, muchos con exposición total al sol, en tanto que otros aparecen en el bosque inundado, en donde la relación de nutrientes y sombra permanente es propicia para las formas inmaduras de la especie (26) e influye en su desarrollo embriológico y larval (52).

En este mismo contexto, se pudo establecer un agrupamiento por región, en el cual las poblaciones de Pacurita y Beté de Chocó conformaron un único grupo externo y las poblaciones de la región oriental conformaron otro grupo mayor relacionado. Ello significa que las barreras geográficas, representadas por la cordillera de los Andes y los ríos Magdalena y Cauca, han aislado a estas poblaciones debido a la distancia y han contribuido a la fijación de estos rasgos en las poblaciones (13). Las larvas de *An. darlingi* requieren de condiciones químicas y físicas estables propias de criaderos grandes, profundos y con aguas claras, que propician temperaturas entre los 20 y los 28 °C y un pH entre 6,5 y 7,3 (53). Sin embargo, factores como la deforestación para abrir espacio a la agricultura y a la actividad minera, generan criaderos totalmente expuestos al sol que pueden alcanzar temperaturas de hasta 40 °C, con efectos importantes en el desarrollo de la especie y sus características morfológicas (54,55). Estos cambios en la composición del paisaje afectan la disposición de los criaderos y determinan cambios en la temperatura y la humedad relativa ambiental, que afectan el desarrollo de las formas inmaduras y la tasa de vuelo de los adultos.

En la taxonomía de las poblaciones de *An. darlingi* en Colombia es importante considerar que algunos individuos presentan una mayor proporción de manchas PHD/HP, con un rango entre 2,0 y 5,0

para este rasgo, y agrupó en este estudio el 89 % del total de los especímenes analizados. El rango propuesto no afecta la separación de *An. darlingi* de otras especies de la sección Argyritarsis, a la cual pertenece (4,47), con excepción de *An. pictipennis* Philippi, 1865, con valores de PHD/HP que oscilan entre 2,0 y 3,0 (4), pero cuya distribución geográfica se encuentra restringida a la región central de Chile y occidental de Argentina (56),y que se distingue, además, por presentar el quinto palpómero totalmente claro y no tener tufos oscuros caudolaterales en los segmentos abdominales (4,47).

Asimismo, la relación entre la longitud total del tarsómero posterior II y su correspondiente área oscura ($DS\text{-}III_2/Ta\text{-}III_2$), la cual se propone en el rango de 0,35 a 0,55 (4,47), es un rasgo sólido de diagnóstico para todas las poblaciones de *An. darlingi* estudiadas, ya que agrupó al 89 % de los especímenes y constituyó la variable más relevante en la asignación de individuos a cada población al hacer el análisis discriminante.

La selección de puntos de referencia para el análisis de morfometría geométrica en alas de mosquitos del género *Anopheles*, debe establecerse con base en los sitios de intersección de las venas alares (41) y no con respecto a la ubicación relativa de las manchas alares sobre la vena costal (57), debido a que, como se encontró en el presente estudio, estas varían en longitud y posición. Además de representar la variación morfológica de caracteres diagnósticos para la especie, al igual que las manchas de la vena costal, los puntos de referencia en las alas permiten estimar los parámetros de forma y tamaño, características de gran interés epidemiológico (14,15), tanto por la dispersión de adultos durante el vuelo (18-21) como por la relación de su tamaño corporal y el número de ingestiones de sangre para el completo desarrollo de los ciclos gonotróficos (16,17).

En el presente estudio, se encontró que los puntos de referencia cuatro, seis y siete, así como las variaciones en las regiones cubital y anal en las alas, constituyeron rasgos de importancia para diferenciar las poblaciones de *An. darlingi* evaluadas. Se sugiere tener en cuenta estas variaciones de la forma alar en trabajos posteriores y establecer si dichos cambios están relacionados con variables ambientales locales.

La búsqueda y la selección de la fuente de sangre por parte de las hembras de anofelinos depende tanto del acervo genético propio de la población como de las características ecológicas del área geográfica, de los patrones de vuelo y de la disponibilidad de la fuente de sangre. Se ha encontrado que la especie puede tener rangos largos de vuelo, de hasta 7,2 kilómetros, con ayuda del viento (58). No obstante, se considera que los adultos de *An. darlingi* se agrupan en pequeñas áreas cercanas a los criaderos, lo que contribuye a reducir la necesidad de vuelos largos (9) y a hacer un uso más eficiente de la energía. En este contexto, el tamaño y la forma alar de las poblaciones, características definidas por su genética (11-13), y las variables abióticas ambientales y de los criaderos (2,57), constituyen aspectos fundamentales para el vuelo de la especie y, por ende, para establecer las características de la bionomía propia de cada población. En poblaciones de *An. darlingi* de Brasil, se encontró que la longitud de la mancha prehumeral clara (PHP) de la vena costal cambió en función del tamaño del ala de mosquitos con diferente tamaño alar (9), por lo que es claro que los estudios de morfometría lineal deben considerar la forma y el tamaño alar establecidos mediante la morfometría geométrica.

El presente estudio permitió definir 19 patrones de manchas alares, así como confirmar que la relación de DS-III2/Ta-III2 constituye un rasgo sólido para el diagnóstico taxonómico, y que se encuentran diferencias en el tamaño corporal y la forma de las alas en las poblaciones naturales de *An. darlingi* en Colombia. Desde el punto de vista de la taxonomía 'integrativa' (59), el estudio de poblaciones de insectos asociados como vectores y que, además, presentan características genéticas que los definen como complejos, deben evaluarse integralmente para definir su estatus taxonómico y la asociación de los diversos aspectos de su bionomía, lo cual es fundamental para determinar estrategias de vigilancia entomológica y de control.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Facultad de Ciencias Agrarias, y la convocatoria de Semilleros de Investigación de la División de Investigación, sede Bogotá. Los especímenes se recolectaron en el marco del proyecto *Malaria Vector Biology in Brazil: Ecology and Genetics* financiado por *The National Institutes of Health* (NIH, R01 AI5413) y la Universidad Nacional de Colombia (Quipu 201010012197). Los mosquitos de la población

de Beté se recolectaron en el marco del proyecto "Análisis morfométrico y molecular de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 (Dip.: Culicidae) en Colombia", financiado por Colciencias y la Universidad del Valle, Colombia.

Referencias

1. **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, *et al*.** Malaria vector species in Colombia: A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:223-38. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028
2. **Brochero H, Rey G, Buitrago L, Olano V.** Biting activity and breeding sites of *Anopheles* species in the municipality Villavicencio, Meta, Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21:182-6. https://doi.org/10.2987/8756-971X(2005)21[182:BAABSO]2.0.CO;2
3. **Quiñones M, Ruiz F, Calle D, Harbach R, Erazo H, 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. https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000600007
4. **Linthicum K.** A revision of the Argyritarsis section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1988;20:98-271.
5. **Manguin S, Roberts D, Andre R, Rejmankova E, Hakre S.** Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize. J Med Entomol. 1996;33:205-11.
6. **Loaiza J, Scott M, Bermingham E, Rovira J, Sanjur O, Conn J.** Short report: *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in Panamá. Am J Trop Med Hyg. 2009;81:23-6.
7. **Olano VA, Brochero HL, Sáenz R, Quiñones ML, Molina JA.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica. 2001;21:402-8.
8. **Harbach R, Roberts D, Manguin S.** Variation in the hindtarsal markings of *Anopheles darlingi* (Diptera; Culicidae) in Belize. Mosq Syst. 1993;25:192-7.
9. **Charlwood JD.** Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:391-8. https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000400001
10. **Mirabello L, Conn J.** Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity. 2006;96:311-21. https://doi.org/doi:10.1038/sj.hdy.6800805
11. **Mirabello L, Vineis J, Yanoviak S, Scarpassa V, Póvoa M, Padilla N, *et al*.** Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. BMC Ecol. 2008;8:3. https://doi.org/10.1186/1472-6785-8-3
12. **Gutiérrez L, Gómez G, González J, Castro M, Luckhart S, Conn J, *et al*.** Microgeographic genetic variation of the malaria vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:38-47. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0381
13. **Naranjo N, Conn J, Correa M.** Behavior and population structure of *Anopheles darlingi* in Colombia. 2016. Infect Genet Evol. 2016;39:64-73. https.//doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.004
14. **Rubio-Palis Y.** Caracterización morfométrica de poblaciones del vector de malaria *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root (Diptera: Culicidae) del sur de Venezuela. Boletín de Entomología Venezolana. 1998;13:141-72.
15. **Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MA.** Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. Infect Genet Evol. 2012;12:1246-52. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.002
16. **Dujardin JP.** Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 2008;8:875-90. https://doi.org/https.//doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.011
17. **Dudley R.** The biomechanics of insect flight: Form, function, evolution. Princeton, NJ: Princeton University Press; 2002. p. 84-92.
18. **Norberg U.** How a long tail and changes in mass and wing shape affect the cost for flight in animals. Functional Ecology. 1995;9:48-54.
19. **Fusco G, Minelli A.** Phenotypic plasticity in development and evolution: Facts and concepts. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365:547-56. https.//doi.org/10.1098/rstb.2009.0267
20. **Gómez GF, Márquez EJ, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM.** Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and presence of a metapopulation. Acta Tropica. 2014;135:75-85. https.//doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.020
21. **Lorenz C, Marques TC, Sallum MA, Suesdek L.** Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). Parasit Vectors. 2014;7:581. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0581-8
22. **Fajardo-Ramos M, González-Obando R, Suárez MF, López D, Wilkerson R, Sallum M.** Morphological analysis of three populations of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae) from Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:85-92. https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100013
23. **Quiñones M, Harbach R, Calle D, Ruiz F, Erazo H, Linton Y.** Variante morfológica de adultos hembras de *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. Biomédica. 2001;21:351-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v21i4.1128
24. **Calle DA, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo N.** 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. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800021
25. **Dantur-Juri M, Liria J, Navarro JC, Rodríguez R, Fritz GN.** Morphometric variability of *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) from different ecoregions of Argentina and Bolivia. Florida Entomologist. 2011;94:428-38. https://doi.org/10.1653/024.094.0307
26. **Jiménez IP, Conn JE, Brochero H.** Preliminary biological studies on larvae and adult *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Miraflores, a malaria endemic locality in Guaviare department, Amazonian Colombia. J Med Entomol. 2014;51:1002-9. https://doi.org/10.1603/ME13146
27. **Jiménez IP, Conn JE, Brochero H.** Malaria vectors in San José del Guaviare, Orinoquia, Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 2014;30:91-8. https://doi.org/https.//doi.org/10.2987/13-6382.1

28. **Durán JS.** Determinación del papel en la transmisión de malaria de las especies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) de dos localidades endémicas para malaria en Colombia (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2014.

29. **Jiménez P, Conn JE, Wirtz R, Brochero H.** *Anopheles* (Díptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia. Biomédica. 2012;32:13-21. https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000500003

30. **Wilkerson RC, Peyton EL.** Standardized nomenclature for the costal wing spots of the genus *Anopheles* and other spotted-wing mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1990;27:207-24.

31. **Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH.** Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. J Med Entomol. 2005;42:777-9. https://doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0777:ACOPSA]2.0.CO;2

32. **Harbach RE, Knight KL.** Taxonomists' glossary of mosquito anatomy. Marlton, New Jersey: Plexus Publishing Inc.; 1980.

33. **Harbach RE, Knight KL.** Corrections and additions to Taxonomists' glossary of mosquito anatomy. Mosq Syst. 1982;13:201-17.

34. **Freeman MF, Tukey JW**. Transformations related to the angular and square root. Ann Math Statist. 1950;21:607-11.

35. **Shapiro SS, Wilk MB.** An analysis of variance test for normality (Complete Samples). Biometrika. 1965;52:591-611. https://doi.org/10.2307/2333709

36. **Balzarini MG, González L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo JA, Robledo CW.** Infostat. Manual del Usuario. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas; 2008.

37. **Hotelling H.** The economics of exhaustible resources. J Polit Econ. 1931;39:137-75. https://doi.org/https.//doi.org/10.1086/254195

38. **Sokal RR, Michener CD.** A statistical methods for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin. 1958;38:1409-38.

39. **Fisher RA.** The use of multiple measurements in taxonomy problems. Annals of Eugenics. 1936;7:79-188.

40. **Guisande C, Heine J, García-Roselló E, González-Dacosta J, Pérez-Schofield B, González-Vilas L, *et al.*** RWizard, version 2.3. University of Vigo. España; 2014. Fecha de consulta: 11 de septiembre de 2016. Disponible en: http://www.ipez.es/RWizard

41. **Toro-Ibacache MV, Manriquez-Soto G, Suazo-Galdames I.** Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. Int J Morphol. 2010;28:977-90.

42. **Rohlf JF.** TPSDig2, version 2.18. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. New York; 2015. Fecha de consulta: 20 de abril de 2015. Disponible en: http://life.bio.sunysb.edu/morph/

43. **Klingenberg CP.** MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. Mol Ecol Resour. 2011;11:353-7.

44. **Rohlf FJ, Marcus LF.** A revolution morphometrics. Trends Ecol Evol. 1993;8:129-32. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x

45. **Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW.** InfoStat, version 2014. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; 2011. Fecha de consulta: 20 de abril de 2015. Disponible en: http://www.infostat.com.ar/

46. **Klingenberg CP.** Size, shape, and form: Concepts of allometry in geometric morphometrics. Dev Genes Evol. 2016;226:113-37. https://doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2

47. **Faran M, Linthicum L.** Handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1981;13:1-81.

48. **Kruskal WH, Wallis WA.** Use of ranks in one-criterion variance analysis. J Am Stat Assoc. 1952;47:583-621.

49. **Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - 2009.** Boletín informativo sobre el monitoreo del fenómeno de El Niño. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2017. Disponible en: http://www.ideam.gov.co/web/pronosticos-y-alertas/pronosticos-alertas/fenomenos-el-nino-y-la-nina

50. **Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - 2012.** Boletín informativo sobre el monitoreo del fenómeno de El Niño. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2017. Disponible en: http://www.ideam.gov.co/web/pronosticos-y-alertas/pronosticos-alertas/fenomenos-el-nino-y-la-nina

51. **Rubio-Palis Y, Zimmerman RH.** Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. J Med Entomol. 1997;34:499-510. https.//doi.org/10.1093/jmedent/34.5.499

52. **Rejmánková E, Grieco J, Achee N, Roberts DR.** Ecology of larval habitats. En: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. InTech; 2013. https.//doi.org/10.5772/55229

53. **Hiwat H, Bretas G.** Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: A review. Parasit Vectors. 2011;4:177. https://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-177

54. **Rozendaal J.** Observations on the distribution of anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector *An. darlingi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;82:221-34. https://doi.org/10.1590/S0074-02761990000200014

55. **Brochero H, Pareja P, Ortiz G, Olano V.** Sitios de cría y actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el municipio de Cimitarra, Santander, Colombia. Biomédica. 2006;26:269-77. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i2.1416

56. **Rueda LM, Rodríguez JA, Bertugio MC, Pecor JE, Li C, Wilkerson RC.** *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *pictipennis*: A new mosquito record from the Atacama region of northern Chile. J Am Mosq Control Assoc. 2008;24:448-9. https://doi.org/10.2987/5692.1

57. **Calle DA, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo N.** Differentiation by geometric morphometrics among 11 *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) in Colombia. Biomédica. 2008;28:371-85. https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.75

58. **Charlwood JW, Alecrim WA.** Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. Ann Trop Med Parasitol. 1989;83:569-76.

59. **Dayrat B.** Towards integrative taxonomy. Biol J Linn Soc Lond.2005;85:407-15. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x

Biomédica 2017;37(Supl.2):135-42
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3474

ARTÍCULO ORIGINAL

Infección de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) con el genotipo asiático-americano del virus del dengue serotipo 2 en Medellín y su posible papel como vector del dengue en Colombia

Andrés Gómez-Palacio[1], Juan Suaza-Vasco[2,3], Sandra Castaño[4], Omar Triana[4], Sandra Uribe[2]

[1] Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia
[2] Grupo de Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia
[3] Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[4] Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* son reconocidos vectores de arbovirus como los del dengue, la fiebre amarilla, el chikungunya y el Zika, en regiones tropicales y subtropicales del mundo. En Colombia, la distribución geográfica de *Ae. albopictus* ha sufrido un incremento y hoy incluye ciudades como Cali y Medellín. Hasta ahora, sin embargo, no se ha recabado información concluyente sobre su infección viral y su capacidad de transmisión a los humanos.
Objetivo. Determinar la infección natural por dengue en ejemplares de *Ae. albopictus* recolectados en un área urbana de Medellín.
Materiales y métodos. Se recolectaron individuos de *Ae. albopictus* en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Se confirmó su clasificación taxonómica mediante el análisis del gen citocromo oxidasa I (*COI*), y se extrajo el ARN total para la identificación del virus del dengue y de los respectivos serotipos. La presencia del genotipo DENV se infirió mediante el análisis del gen *NS3*.
Resultados. El análisis del *COI* corroboró el estatus taxonómico de *Ae. albopictus*. Uno de los mosquitos procesados fue positivo para DENV-2 y el análisis del *NS3* mostró una gran similitud con el genotipo asiático-americano.
Conclusión. Se reporta la infección con DENV-2 en *Ae. albopictus* en Medellín, Colombia. La presencia del genotipo asiático-americano en una zona urbana sugiere su posible circulación entre humanos y en *Ae. albopictus*, lo cual alerta sobre su eventual papel en la transmisión del DENV-2, y sobre la necesidad de incluir esta especie en la vigilancia entomológica en Colombia.

Palabras clave: *Aedes*; control de vectores; virus del dengue; genotipo; filogenia; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3474

***Aedes albopictus* (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellín suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia**

Introduction: *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* are recognized vectors of dengue, yellow fever, chikungunya and Zika arboviruses in several countries worldwide. In Colombia, *Ae. albopictus* geographical distribution has increased to include highly populated cities such as Cali and Medellín. Although this species has been frequently found in urban and semi-urban zones in the country, its role as vector of the dengue fever is poorly known.
Objective: To identify the presence of *Ae. albopictus* specimens naturally infected with dengue virus collected in Medellín.
Materials and methods: Insects were collected in the *Universidad Nacional de Colombia* campus in Medellín. Individuals were classified as *Ae. albopictus* and confirmed by DNA barcode region analysis. Mosquitoes were processed for dengue virus identification, and a fragment of the *NS3* gen was sequenced and compared with DENV-2 genotypes reported in the literature.
Results: Sequence analysis of *COI* indicated *Ae. albopictus* individuals were similar to those recently reported in Colombia, and genetically close to those from other regions worldwide. Among the pools tested one was positive for DENV-2, and the *NS3* analysis indicated it belonged to the Asian-American clade.

Contribución de los autores:
Andrés Gómez-Palacio: concepción y análisis del estudio, escritura del manuscrito
Juan Suaza-Vasco: recolección de ejemplares y desarrollo del trabajo en campo
Sandra Uribe: participación en todas las etapas de la investigación
Todos los autores participaron en la clasificación taxonómica y los análisis genéticos y moleculares.

Conclusion: We report the presence *Ae. albopictus* naturally infected with the Asian-American genotype of DENV-2 in Colombia. The presence of *Ae. albopictus* specimens carrying the most common genotype infecting humans in a highly populated city such as Medellín indicates its potential role as dengue vector in Colombia and highlights the relevance of including it in current vector surveillance strategies.

Key words: *Aedes*; vector control; dengue virus; genotype; phylogeny; Colombia

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3474

Se cree que, al igual que *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), *Ae. (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) es una especie importante en la transmisión de arbovirus como los del dengue, la fiebre amarilla, el chikungunya y el Zika en diversas regiones del mundo. No obstante, su papel real como vector en Latinoamérica apenas comienza a estudiarse (1).

La fiebre por dengue se reconoce ampliamente como una de las infecciones virales con mayor incidencia en el mundo, tal como ocurre en grandes ciudades de Colombia, como Medellín, Cali y Cúcuta, entre otras. La infección es causada por algunos de los genotipos que componen el acervo genético de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 a DENV-4). El surgimiento de los focos epidémicos de dengue y de la fiebre hemorrágica por dengue se ha asociado a la presencia de uno cualquiera de estos cuatro serotipos, así como a la circulación simultánea de genotipos debida a la colonización o al surgimiento de linajes más patógenos en un periodo determinado (2). Se han descrito cinco genotipos epidémicos del DENV-2: el asiático I (AS-I), el asiático II (AS-II), el asiático-americano (AS/AM), el cosmopolita (COS) y el americano (AM) (3), de los cuales el AM y el AS/AM son los más frecuentemente asociados a focos epidémicos de dengue en muchas regiones tropicales y subtropicales de Suramérica, incluida Colombia (4).

Aedes albopictus es originario del oriente de India (5), desde donde se dispersó por el oeste hasta las islas Mauricio y Madagascar y, posteriormente, colonizó múltiples regiones en el continente americano. En América se ha reportado desde 1981 en los Estados Unidos (6), país en el cual se distribuye ampliamente, incluso en zonas con presencia de *Ae. aegypti*, por lo que representa un gran riesgo para la población y un importante reto para las autoridades de salud (7). *Aedes albopictus* se encuentra también en México (8) y en diversos países de Centroamérica. En Suramérica, *Ae. albopictus* se detectó en Brasil en 1986 (9), donde la especie se ha distribuido rápidamente hacia zonas urbanas (10), y se ha evidenciado como vector del virus del dengue (11). También se ha reportado en Argentina (12), desde donde se cree que ha seguido dispersándose hacia las regiones más al norte del Cono Sur. Aunque su rango de expansión es aún difícil de precisar, continúa siendo objeto de interés por su potencial papel como vector (1,5).

En Colombia, *Ae. albopictus* se reportó inicialmente en 1998 en la ciudad de Leticia, en el departamento de Amazonas, limítrofe con Brasil (13). Años más tarde, se reportó en Cali (14) y, más recientemente, en el municipio de La Tebaida, departamento del Quindío (15), y en Istmina, departamento del Chocó, limítrofe con Panamá (16). En Medellín, la presencia de *Ae. albopictus* ha sido constante desde el 2011, y frecuentemente se han encontrado individuos en zonas céntricas de la ciudad como el Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe (17) y el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (18).

A pesar de su importancia como potencial vector del dengue y otros arbovirus en Colombia, la información sobre su ecología y evolución, así como sobre su papel epidemiológico, es aún escasa. El único trabajo publicado hasta la fecha sobre la infección viral en *Ae. albopictus* en el país, se hizo en individuos recolectados en el municipio de Buenaventura (Valle del Cauca) durante los años 2002 y 2004 (19). En ese estudio se reportó la infección natural de *Ae. albopictus* con el DENV-1 y el DENV-2, y se sugirió su posible papel en la dinámica de trasmisión del dengue en esa localidad (19). En el resto del país, a pesar de que la especie se viene reportando cada vez con mayor frecuencia, persiste un gran desconocimiento sobre su capacidad de infección, así como sobre los serotipos y los genotipos virales circulantes.

En el presente trabajo se reporta la infección de *Ae. albopictus* con el genotipo asiático-americano del DENV-2 en Medellín y se aporta información sobre el posible origen de este vector en el Valle de Aburrá.

Correspondencia:
Andrés Gómez-Palacio, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Avenida Central del Norte N° 39-115, Tunja, Colombia
Teléfono: (758) 740 5626
amgomezpa@gmail.com

Recibido: 10/08/16; aceptado: 28/07/17

Materiales y métodos

Insectos y extracción de ADN

Se recolectaron nueve individuos en áreas de fitotelmata en un relicto de bambú americano (*Guadua* sp.) y en un árbol de jardín (*Ficus* sp.) (figura 1) durante enero y febrero de 2016 en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, localizado en el área urbana de la ciudad.

Los mosquitos se almacenaron vivos en tubos cónicos de 1,5 ml hasta su identificación taxonómica con la clave de Forattini (20). A cinco de los nueve mosquitos se les removieron las dos patas posteriores para su validación molecular usando el gen citocromo oxidasa I (*COI*). Se extrajo el ADN total de cada ejemplar utilizando solución tampón de macerado según protocolo previamente reportado para mosquitos (21). Los restos de los mosquitos se almacenaron en RNAlater® en grupos compuestos por uno a cuatro individuos según el lugar de su captura, para su posterior procesamiento.

Amplificación del gen COI en Aedes albopictus

Se amplificó un fragmento de 700 pares de bases (pb) del gen *COI,* propuesto como el código de barras genético en diferentes organismos (22), mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los iniciadores MTNF y MTNR, como se ha reportado previamente (23).

Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 60 segundos, a 50 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante otros 60 segundos,y una etapa de extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Todos los productos positivos se purificaron y se enviaron a la empresa Macrogen (http://dna.macrogen.com) para su secuenciación.

Extracción del ARN, síntesis del ADN complementario y tipificación del DENV

En cada grupo de mosquitos se extrajo el ARN total usando el estuche RNeasy Mini Kit® (Qiagen) según el protocolo recomendado por el fabricante. Para la síntesis del ADN complementario de un fragmento de 470 pb del gen *NS3*, se hizo una PCR con transcripción inversa (*reverse transcription*-PCR, RT-PCR) usando el iniciador DV3 (5'-AARTGIGCYTCRTCCAT-3') previamente reportado para dengue (24). Las condiciones de la



Figura 1. Lugares de recolección de *Ae. albopictus* en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (coordenadas geográficas: 6°26'07,5''N, -75°57'69,8''O; *World Geodetic System*, WGS 84) Fotos: Alejandra M. Clavijo

RT-PCR consistieron en un volumen final de 20 µl de una mezcla que contenía 10 µl de ARN total, 4 µl de solución tampón (5x), 2 µl de dNTP (10 mM), 2 µl del iniciador DV3 (10 µM), y 2 µl de 20 x 10^3 U/µl de transcriptasa inversa (Thermo®). Esta mezcla se amplificó durante un ciclo de 60 minutos a 42 °C seguido por un ciclo de 10 minutos a 90 °C, según protocolo descrito previamente (24).

El DENV se tipificó mediante una PCR semianidada en dos pasos: inicialmente se usaron los iniciadores DV1 (5'-GGRACKTCAGGWTCTCC-3') y DV3 (24) para amplificar un fragmento de 470 pb del gen *NS3*. Las condiciones de la PCR consistieron en un volumen final de 25 µl que contenía 3 µl de ADNc, 2,5 µl de solución tampón (10x), 2 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 µl de dNTP (2 mM), 0,5 µl de los iniciadores DV1 y DV3 (10 µM), y 5U/µl de polimerasa (Thermo®).

El perfil de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante un minuto, seguida de 30 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante 40 segundos para cada uno y, por último, una extensión a 72 °C durante cinco minutos. Posteriormente, se

hizo una segunda amplificación que incluyó el iniciador DV1 y los iniciadores específicos DSP1 (5' – AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG – 3'); DSP2 (5' – CCGGTGTGCTCRGCYCTGAT – 3'); DSP3 (5' – TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG – 3') y DSP4 (5' - CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG – 3'), los cuales amplifican tamaños de 169, 362, 265 y 426 pb para cada uno de los cuatro serotipos del DENV, respectivamente (25).

En esta PCR se empleó un volumen final de 25 µl que contenía 3 µl de ADNc, 2,5 µl de solución tampón (10x), 1,5 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 µl de dNTP (2 mM), 1,25 µl del iniciador DV1 y de cada uno de los iniciadores específicos DSP1 a DSP4 (10 µM), y 5 U/µl de polimerasa (Thermo®).

El perfil de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante cuatro minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 52 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante 30 segundos para cada uno; finalmente, se hizo una etapa de extensión a 72 °C durante cinco minutos.

Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, y los productos positivos se enviaron, para su posterior purificación y secuenciación, a la empresa Macrogen (http://dna.macrogen.com).

Análisis de secuencias y tipificación genética del DENV

Las secuencias de nucleótidos obtenidas tanto para el gen *COI* en *Ae. alpopictus* como para el gen *NS3* del DENV, se ajustaron manualmente usando el programa Bioedit, versión 7.0 (26); todos los alineamientos se hicieron usando la opción "auto" del programa MAFFT, versión 7.2 (27).

Las secuencias del *COI* se compararon con 17 secuencias tomadas del Genbank obtenidas de individuos de 14 países de diferentes regiones de África, América, Asia, Europa y Oceanía (cuadro 1). Además, se incluyeron 13 secuencias de individuos recolectados en el municipio de La Tebaida, Quindío (15). Para la confirmación molecular de la taxonomía de *Ae. albopictus*, *se* construyó una red haplotípica usando el algoritmo *median-joining* con el programa Network, versión 5.0 (http://www.fluxus-engineering.com/). Para la identificación del genotipo del DENV, las secuencias obtenidas se compararon con las de la base de datos del genoma del DENV mediante el programa Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Posteriormente, se hizo el alineamiento de la secuencia parcial de 307 pb del *NS3* con 19 secuencias (cuadro 2) de los genotipos reportados en América (2). A partir de la base de datos compuesta por las secuencias del gen *NS3* del DENV, se estimó la distancia génica pareada basada en el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura (K2-p) (36) y a continuación se construyó un dendrograma de distancias para cada conjunto de datos basado en el algoritmo *neighbor-joining* con el programa MEGA, versión 6.0.6 (37). El sustento estadístico de los nodos se probó mediante *bootstrap* con 1.000 iteraciones (38).

Cuadro 1. Origen de las secuencias del gen *COI* de *Aedes albopictus* incluidas en este estudio

Continente	País	Código en la figura 2	Genbank	Referencia
África	Camerún	Camerún	JF309317	(28)
	Madagascar	Madagascar	AJ971007	(28)
	Francia (*La Reunión)	Fran_Reu	JN406658	(29)
América	Brasil	Brasil	AJ971003 , AJ971014	(30)
	Colombia	Col_LaTeb	KP877563 - KP877575	(15)
		Col_Med	Este reporte	
	Costa Rica	CosRica	AB907798	(31)
	Estados Unidos	EEUU	KC690940 , KC690944	(32)
	Estados Unidos (*Hawai)	EEUUh	KC690958	(32)
	Panamá	Panama	AB907801	(31)
Asia	India	India	AY729984	(23)
	Singapur	Singapur	KC690926	(32)
Europa	Alemania	Alemania	JX675570	(33)
	Croacia	Croacia	HQ906851	(34)
	Italia	Italia	KC690936	(32)
Oceanía	Australia	Australia	KC572145	(35)
	Papúa Nueva Guinea	PN_Gui	KC572496	(35)

* Departamento o estado de ultramar del respectivo país

Cuadro 2. Descripción de las secuencias de DENV-2 usadas en este trabajo

Genotipo	País	Aislamiento	Año	Genbank
AS/AM	Martinica	98-703	1998	AF208496
	Belice	BID-V2952	2002	FJ898461
	Guatemala	FDA-GUA09	2009	HQ999999
	Nicaragua	BID-V2683	1999	GQ199895
		BID-V2346	2000	FJ850061
		BID-V2659	2000	FJ850062
		BID-V1721	2008	FJ205885
		BID-V4915	2009	HQ705625
AM	Tonga	Tonga74	1974	AY744147
	Venezuela	Ven2	1987	AF100465
	México	131	1992	AF100469
	Perú	IQT2913	1996	AF100468
AS-I	Tailandia	ThD2 0168	1979	DQ181805
		ThD2 0498	1984	DQ181804
		ThD2 0078	2001	DQ181797
AS-II	Nueva Guinea	New_ Guinea_C	1944	AF038403
COS	Australia	TSV01	1993	AY037116
	China	FJ11	1999	AF359579
	Indonesia	BA05i	2004	AY858035

La información de los genotipos se tomó de Añez, *et al*. (2).

Resultados

Análisis del gen COI en Aedes albopictus de Medellín

Se encontró un mismo haplotipo para el fragmento del gen *COI* analizado en los cinco individuos de *Ae. albopictus* recolectados en el municipio de Medellín, similar al observado en la mayoría de los individuos colombianos del municipio de La Tebaida en el Quindío (15) y de un individuo de la isla de Papúa, Nueva Guinea (35) (figura 2). No se encontró ninguna diferencia significativa entre los haplotipos de los distintos orígenes geográficos, ya que no los separan más de cuatro pasos de mutación (figura 2).

Genotipificación del DENV-2 e identificación del genotipo viral

Solo en uno de los tres grupos de insectos evaluados, la amplificación tuvo un tamaño similar al esperado para la presencia del DENV-2 (figura 3). El análisis filogenético del DENV-2 ubicó la secuencia identificada en *Ae. albopictus* de Medellín dentro del clado compuesto por los aislamientos pertenecientes al genotipo asiático-americano, con un alto sustento de nodo (*bootstrap*=100) y claramente diferenciado de los restantes genotipos (figura 4). Cabe resaltar que dentro del genotipo asiático-americano la secuencia del fragmento del gen *NS3* de *Ae. albopictus* mostró más similitud con el aislamiento más antiguo (1998) e insular (Martinica) que con los restantes, más recientes y continentales (figura 4).

Discusión

El tigre asiático, como se conoce a *Ae. albopictus*, es considerado uno de los vectores de arbovirus más invasivos y ampliamente distribuidos en el mundo. Desde su ingreso al continente americano, presumiblemente en la década de los años 80, este insecto ha ido incrementando paulatinamente su distribución geográfica en áreas densamente pobladas con buenas condiciones de saneamiento, lo que llama la atención sobre su real papel en la emergencia y reemergencia de importantes virosis como el dengue, el chikungunya y el Zika.

A diferencia de *Ae. aegypti*, sobre cuyo origen y procesos de dispersión en América se han propuesto distintas hipótesis (39), hasta el momento no hay un consenso claro sobre la historia demográfica de *Ae. albopictus* y, menos aun, sobre los procesos que dieron origen a las poblaciones americanas (32). A pesar de que el primer registro de esta especie en Colombia data de más de 19

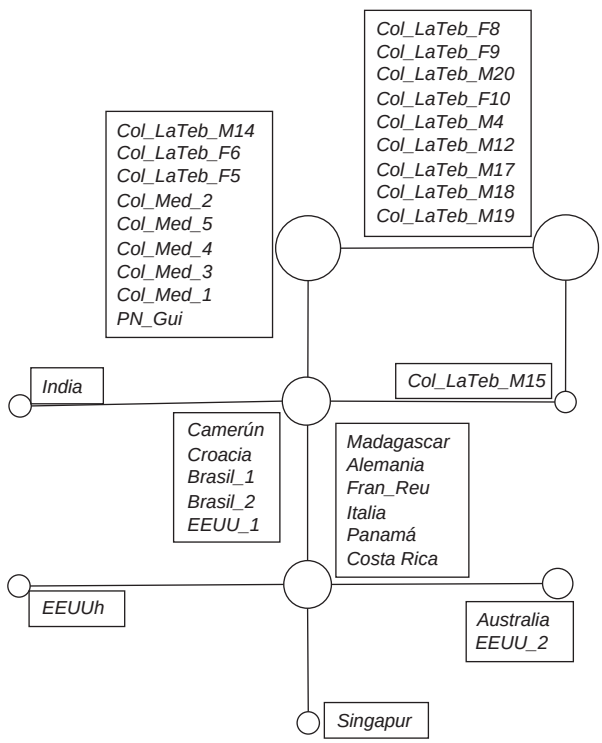


Figura 2. Red haplotípica estimada mediante el algoritmo *median-joining* del gen *COI* en *Ae. albopictus.* El tamaño de los círculos indica la frecuencia haplotípica y las líneas que conectan los haplotipos indican un paso mutacional. Los detalles del origen de las secuencias se presentan en el cuadro 1.

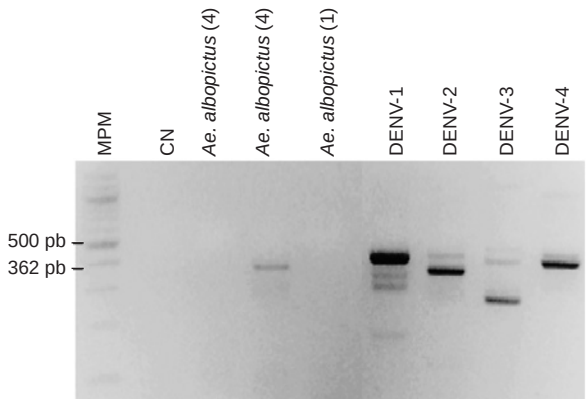


Figura 3. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se visualiza la amplificación de un fragmento aproximado de 362 pb indicativo de la presencia de DENV-2 en un grupo de individuos de *Ae. albopictus* recolectados en Medellín. Los números entre paréntesis indican el número de insectos incluidos en cada grupo según el sitio de recolección. MPM: marcador de peso molecular; CN: control negativo

años, muy poco se ha estudiado su composición y estructura poblacional. En el trabajo más reciente se sugiere que las poblaciones colombianas, particularmente las del municipio de La Tebaida en Quindío, tienen un origen asiático (de Singapur) (15), dada la similitud de nucleótidos de los haplotipos del gen *COI* en este municipio, con dos haplotipos de Singapur reportados en un estudio anterior (32).

En este trabajo se encontró que los individuos de *Ae. albopictus* recolectados en Medellín presentaban el mismo haplotipo del *COI* reportado para varios de los individuos de La Tebaida e, igualmente, se observó una relación cercana con los demás haplotipos de *Ae. albopictus* en diversos países del mundo. Estos resultados aportan información comprobada en apoyo de la hipótesis de un único origen ancestral asiático de las poblaciones colombianas (ampliamente aceptado) y eventualmente permitirían sugerir una composición panmítica de las poblaciones de este vector en Colombia. No obstante, debido a la ausencia de información concluyente y de un tamaño de muestra representativo, no es posible establecer un país o lugar puntual de origen, ni una clara estructura o composición poblacional de *Ae. albopictus* en Colombia. En este sentido, llamamos la atención sobre la necesidad de desarrollar estudios que indaguen sobre su filogeografía y estructura poblacional en el país.

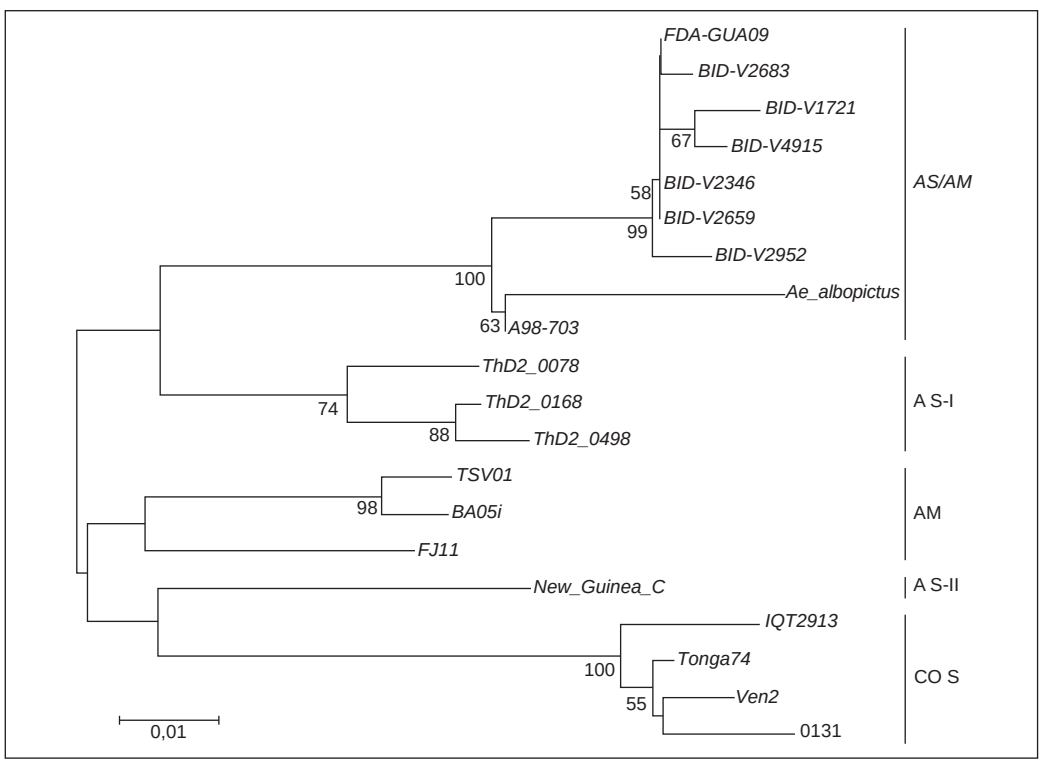


Figura 4. Dendrograma de distancias genéticas basadas en K2-p de un fragmento de 307 pb del gen *NS3* del DENV-2. Se muestran los clados correspondientes a los genotipos del DENV-2 reportados en Añez, *et al.* (2); se incluye el encontrado en *Aedes albopictus* de Medellín en este trabajo. Los números bajo los nodos indican el valor de *bootstrap* obtenido de 1.000 iteraciones (solo se muestran los valores >50).

La presencia de *Ae. albopictus* naturalmente infectado con DENV-1 y DENV-2 en Colombia, se reportó inicialmente en el municipio de Buenaventura, Valle del Cauca (19). Allí se observó la concurrencia de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* durante el periodo de estudio (2002-2004), así como una correlación positiva entre la tasa de infección entomológica y el incremento en el número de casos positivos de dengue en humanos (19). Aunque estos resultados no demuestran la incriminación vectorial de *Ae. albopictus*, su participación en la dinámica de transmisión del dengue a los humanos no puede descartarse.

En el presente estudio se reporta la presencia de *Ae. albopictus* infectado con DENV-2 en Medellín. Este hallazgo concuerda con lo reportado en Buenaventura, por lo cual también podría considerarse su eventual papel en la dinámica de transmisión del dengue en esta ciudad. Además, los resultados presentados indican la circulación del genotipo asiático-americano del DENV-2 en *Ae. albopictus* de Medellín. Este es el genotipo más frecuente en América desde los años 90, y en Colombia se ha reportado frecuentemente en pacientes febriles con cuadro clínico indicativo de dengue en cuadros todo el país (4), por lo que se sugiere que *Ae. albopictus* puede tener un papel en la transmisión del dengue a los humanos. Sin embargo, esta hipótesis, así como el grado de riesgo epidemiológico atribuible a *Ae. albopictus,* deberá comprobarse en futuros estudios.

Teniendo en cuenta el potencial papel de *Ae. albopictus* como vector en Colombia, se propone que esta especie se incluya en las estrategias de vigilancia y control vectorial del dengue en el país. En este sentido, es importante mencionar que desde el hallazgo de *Ae. albopictus* en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, en enero y febrero de 2016, periódicamente se hace la revisión y la descripción de sus criaderos, así como la recolección de adultos para el estudio de diversos aspectos de su ciclo de vida bajo condiciones de laboratorio, y la evaluación de su infección con el virus del dengue mediante RT-PCR.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Antioquia y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia.

Referencias

1. **Rúa-Uribe GL, Suárez-Acosta CR, Rojo RA.** Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2012;30:328-37.
2. **Añez G, Morales-Betoulle ME, Ríos M.** Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. PLoS One. 2011;6:e27459. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027459
3. **Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, *et al.*** Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology. 1997;230:244-51. https://doi.org/10.1006/viro.1997.8504
4. **Méndez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sánchez JA, Tenorio A, *et al*.** Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. Virol J. 2012;9:64. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-64
5. **Rey JR, Lounibos P.** Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. Biomédica. 2015;35:177-85. https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514
6. **Sprenger D, Wuithiranyagool T.** The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. J Am Mosq Control Assoc. 1986;2:217-9.
7. **Porse CC, Kramer V, Yoshimizu MH, Metzger M, Hu R, Padgett K, *et al*.** Public health response to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes invading California, USA. Emerg Infect Dis. 2015;21:1827-9. https://doi.org/10.3201/3210.150494
8. **Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, *et al*.** First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, México. Med Vet Entomol. 1997;11:305-9. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00413.x
9. **Forattini OP.** Identification of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Brazil. Rev Saúde Pública. 1986;20:244-5. https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000300009
10. **Honório NA, da Costa Silva W, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R.** Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:191-8. https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000200005
11. **Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, *et al*.** Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. PLoS One. 2012;7:e41386. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041386
12. **Vezzani D, Carbajo AE.** *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:66-74. https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000003
13. **Vélez ID, Quiñones ML, Suárez M, Olano V, Murcia LM, Correa E, *et al*.** Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. Biomédica. 1998;18:192-8. https://doi.org/10.7705/biomedica.v18i3.990

14. **Cuéllar-Jiménez ME, Velásquez-Escobar OL, González-Obando R, Morales-Reichmann CA.** Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Cali, Valle del Cauca, Colombia. Biomédica. 2007;27:273-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i2.224

15. **Zamora-Delgado J, Castaño JC, Hoyos-López R.** DNA barcode sequences used to identify *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in La Tebaida (Quindío, Colombia). Rev Col Entomol. 2015;41:212-7.

16. **Carvajal JJ, Honorio NA, Díaz SP, Ruiz ER, Asprilla J, Ardila S, *et al*.** Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en el municipio de Istmina, Chocó, Colombia. Biomédica. 2016;36:438-46. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2805

17. **Rúa-Uribe G, Suárez-Acosta C, Londoño V, Sánchez J, Rojo R, Bello-Novoa B.** Primera evidencia de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Medellín, Antioquia - Colombia. Revista Salúd Pública de Medellín. 2011;5:89-98.

18. **Suaza JD, Barajas J, Galeano E, Uribe S.** Criaderos naturales para *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) y *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) vectores de arbovirus en la ciudad de Medellín (Antioquia, Colombia). Boletín del Museo Entomológico Francisco Luis Gallego. 2013;5:18-24.

19. **Méndez F, Barreto M, Árias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, *et al*.** Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:678-83. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.678

20. **Forattini OP.** Culicidología médica. Identificação, biologia, epidemiologia. São Paulo: Editora Da Universidade de São Paulo; 2002. p. 860.

21. **Soto SI, Lehmann T, Rowton ED, Vélez ID, Porter CH.** Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial *ND4* gene. Mol Phylogenet Evol. 2001;18:84-93. https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0863

22. **Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 2003;270:313-21. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

23. **Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P.** DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2007;44:1-7.

24. **Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, *et al*.** Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. Am J Trop Med Hyg. 1998;58:578-86. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.578

25. **Seah CL, Chow VT, Chan YC.** Semi-nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. Clin Diagn Virol. 1995;4:113-20. https://doi.org/10.1016/0928-0197(94)00063-Z

26. **Hall TA.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser. 1999;41:95-8.

27. **Katoh K, Standley DM.** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 2013;30:772-80. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010

28. **Kamgang B, Ngoagouni C, Manirakiza A, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M.** Temporal patterns of abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and mitochondrial DNA analysis of *Ae. albopictus* in the Central African Republic. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2590. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002590

29. **Raharimalala FN, Ravaomanarivo LH, Ravelonandro P, Rafarasoa LS, Zouache K, Tran-Van V, et al.** Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. Parasit Vectors. 2012;5:56. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-56.

30. **Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M, Failloux AB.** Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti (L.)* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. Genet Res. 2005;86:1-11. https://doi.org/10.1017/S0016672305007627

31. **Futami K, Valderrama A, Baldi M, Minakawa N, Marín-Rodríguez R, Chaves LF.** New and common haplotypes shape genetic diversity in Asian tiger mosquito populations from Costa Rica and Panamá. J Econ Entomol. 2015;108:761-8. https://doi.org/10.1093/jee/tou028

32. **Zhong D, Lo E, Hu R, Metzger ME, Cummings R, Bonizzoni M, *et al*.** Genetic analysis of invasive *Aedes albopictus* populations in Los Angeles County, California and its potential public health impact. PLoS One. 2013;8:e68586. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068586

33. **Kampen H, Kronefeld M, Zielke D, Werner D.** Further specimens of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) trapped in southwest Germany. Parasitol Res. 2013;112:905-7. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3128-y

34. **Žitko T, Kovacic A, Desdevises Y, Puizina J.** Genetic variation in East-Adriatic populations of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), inferred from NADH5 and COI sequence variability. Eur J Entomol. 2011;108:501-8. https://doi.org/10.14411/eje.2011.065

35. **Beebe NW, Ambrose L, Hill LA, Davis JB, Hapgood G, Cooper RD, *et al*.** Tracing the tiger: Population genetics provides valuable insights into the *Aedes (Stegomyia) albopictus* invasion of the Australasian Region. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2361. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002361

36. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980;16:111-20.

37. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30:2725-9. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

38. **Efron B, Halloran E, Holmes S.** Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:7085-90.

39. **Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja-Simon Z, *et al*.** Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. Infect Genet Evol. 2012;12:1260-9. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.012

Biomédica 2017;37(Supl.2):143-54
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3452

ORIGINAL ARTICLE

Phylogenetic signal at the *Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* mitochondrial region in *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913

Andrés López-Rubio[1], Juan David Suaza[1], Charles Porter[1], Sandra Uribe[1], Gabriel Bedoya[2], Iván Darío Vélez[3]

[1] Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia
[2] Grupo de Genética Molecular, GENMOL, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[3] Programa de Estudio y Control de Enfermedades, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introduction: Mitochondrial DNA has proven its utility for the study of insect evolution. Genes such as cytochrome b (*Cytb*) and the transfer gene for serine (*SertRNA*) can be used to compare closely related organisms.
Objective: The phylogenetic utility of *Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* was tested for polymorphisms, and secondary structure modeling in *SertRNA* was done to detect possible cryptic species in *Anopheles neivai*.
Materials and methods: Specimens from Colombia, Guatemala, and the type locality in Panamá were collected and sequenced for specimen comparison based on DNA polymorphisms, and secondary structure modeling for the *SertRNA* gene.
Results: Thirty-six sequences for *A. neivai* and *A. pholidotus* were obtained.
Conclusions: Polymorphic variants were detected in *A. neivai* for *Cytb-SertRNA*-IG1- *ND1.* Despite this variation in *A. neivai*, cryptic species could not be detected.

Key words: *Anopheles*; malaria; RNA, transfer; DNA, mitochondrial; Colombia; Panamá; Guatemala.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3452

Señal filogenética de la región *Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* en *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913

Introducción. El ADN mitocondrial ha demostrado su utilidad para el estudio de la evolución en los insectos. Existen algunos genes mitocondriales como el citocromo b (*Cytb*) y el gen de transferencia para el aminoácido serina (*SertRNA*) que pueden usarse en el diagnóstico de especies estrechamente relacionadas.
Objetivo. Explorar la utilidad filogenética de la región *Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* para detectar posibles especies crípticas en *Anopheles neivai*.
Materiales y métodos. Se recolectaron especímenes en Colombia, Guatemala y en la localidad tipo en Panamá, los cuales se secuenciaron y se compararon mediante el polimorfismo de ADN en toda la región y mediante la simulación de estructuras secundarias del gen *SertRNA*.
Resultados. Se obtuvieron las secuencias de especímenes de *A. neivai* (34) y *A. pholidotus* (2).
Conclusiones. Se detectaron algunos polimorfismos para la región*Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* en *A. neivai*, pero no así especies crípticas.

Palabras clave: *Anopheles*; malaria; ARN de transferencia; ADN mitocondrial; Colombia; Panamá; Guatemala.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3452

Anopheles neivai Howard, Dyar & Knab, 1913, is distributed from the Yucatán Peninsula (México) to the Guayas province (Ecuador) (1). In Colombia, it has been recognized as a secondary malaria vector in the Pacific Coast with local importance in small towns such as Charambirá, Santa Bárbara Iscuandé and Buenaventura (2-4). There are also reports of naturally infected females with *Plasmodium*

Author's contributions:
Andrés López-Rubio: DNA sequences, phylogenetic analyses, secondary structure modeling and drafting of the manuscript
Juan David Suaza: Field work, specimens breeding and taxonomic determination
Charles Porter: Counseling on selection of collection sites, verification of specimens taxonomic determinations
Sandra Uribe: Counseling on molecular biology experiments, DNA sequence analyses and manuscript organization
Gabriel Bedoya: Counseling on secondary structure modelling of the SertRNA mitochondrial gene
Iván Darío Vélez: Counseling on the selection of field collection sites and the establishment of controlled breeding conditions
All authors contributed to the critical review of the manuscript.

falciparum in Buenaventura (5). As regards its biology, immature stages develop in bromeliads at mangrove (1). Activity in adults occurs at dawn and dusk (2) when younger females prefer to feed (6) and can be found in homes and in their surroundings (3,7). There are also biting reports in mangrove environments and in boats during fishing activities, which increase the epidemiological risk for local habitants (2).

Anophelines are recognized as a complex group, where it is common to find complexes of cryptic species (8). In Neotropical *Anopheles*, there are recognized cryptic species complexes that have importance as malaria vectors such as *A. triannulatus* (9) and *A. albitarsis* (10). For *A. neivai*, previous research suggests the existence of a species complex (2,11) based on morphological polymorphism and exploratory information on molecular variability (12).

The use of mitochondrial DNA (mtDNA) has played a vital role in understanding the phylogenetic relationships in *Anopheles*, including diversification patterns, divergence time estimation (13,14) and the recognition of cryptic species complexes (15-17). There are several advantages to using mtDNA, including variable mutation rates in eukaryotes, lack of introns, and high abundance of copies, which makes mtDNA relatively easy to obtain even from degraded samples (18). In contrast, phylogenetic signals of mtDNA can be altered by mitochondrial introgression (19) and by indirect selection and linkage disequilibrium caused by maternally inherited symbionts in arthropods (20). For phylogeny studies, fragments of cytochrome oxidase I gene (*COI*), have been extensively used (21-23). However, other genes in the mtDNA genome can be useful for reconstructing evolutionary relationships, including those involved in the respiratory chain complex I and III such as NADH dehydrogenase subunit I (*ND1*) and cytochrome b (*Cytb*) (24,25).

In addition, the transfer RNA genes (*tRNA*), also present in the mitochondrial genome, have a pivotal role in protein biosynthesis (26). The critical function of these genes limits the mutations they can accommodate, which is a desirable tool for studying evolution among closely related organisms. This is particularly important where selective pressure, mutation bias and genetic drift become relevant factors in modeling the codon use for each species (27,28). Furthermore, comparative analysis of the secondary structure of these genes improves the quality of alignments and, thereby, leads to more robust phylogenetic inferences (29,30).

In this work, we explored the phylogenetic utility of a mitochondrial region with fragments of *Cytb*, *ND1* and the secondary structure models of serine transfer RNA (*SertRNA*) variants to differentiate specimens identified morphologically as *A*. *neivai*.

Materials and methods

Specimens from *Kerteszia* were collected from six localities in Chocó, Colombia: Bahía Solano (Playa Potes and Nabugá), Litoral de San Juan (Charambirá), Acandí, Nuquí and Jurubidá, and the Caribbean region near the Sierra Nevada de Santa Marta. In Central America, the type locality for *A. neivai* at Portobelo (Panamá) was sampled, as well as two localities in Guatemala: Puerto Barrios and Chiquimula (figure 1, table 1). All the immature stages were collected in bromeliads using manual pipetting and reared under laboratory conditions to obtain adults (31), while field adults were collected using Shannon traps. Specimen identification was performed with dichotomous identification keys (32,33).

For DNA extraction, two legs were removed from each adult, whereas partial abdomens were used for the larval stages. The DNA extraction procedure for all specimens was based on a grind buffer protocol (34). The subsequent PCR conditions for the *Cytb-tRNASer*-IG1-*ND1* region were as follows: 17.1 µL (dH2O); 6 µL (buffer 5X); 2 µL (dntp [2.5 mM]); 1 µL ($MgCl_2$ [25 mM]); 0.3 µL Gotaq® Flexi (Promega); and 1 µL [10 mM] for primers CB3CF (CAYATTCAACCWGAATGATA) and NINFRGGT AYWTTGCCTCGAWTTCGWTATGA) (35). Primer sequences were modified from previously used primers CB-J-11338 and NI-N-11841 (36). The PCR reactions used the following conditions: 94°C/30 s, 47°C/30 s, 72°C/60 s. All the PCR experiments were performed on a PTC-100 BioRad® thermal cycler. Subsequent fragments were examined by agarose gel electrophoresis (1%). Successive positive PCR fragments were sequenced using an ABI 3500XL® (Applied Biosystems) automated capillary electrophoresis sequencer at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta.

Corresponding author:
Andrés López-Rubio, Calle 59 A N° 63-20, bloque 16, laboratorio 110, Medellín, Colombia
Teléfono: (313) 624 4845
andreslop27@gmail.com

Received: 12/08/16; accepted: 15/08/17

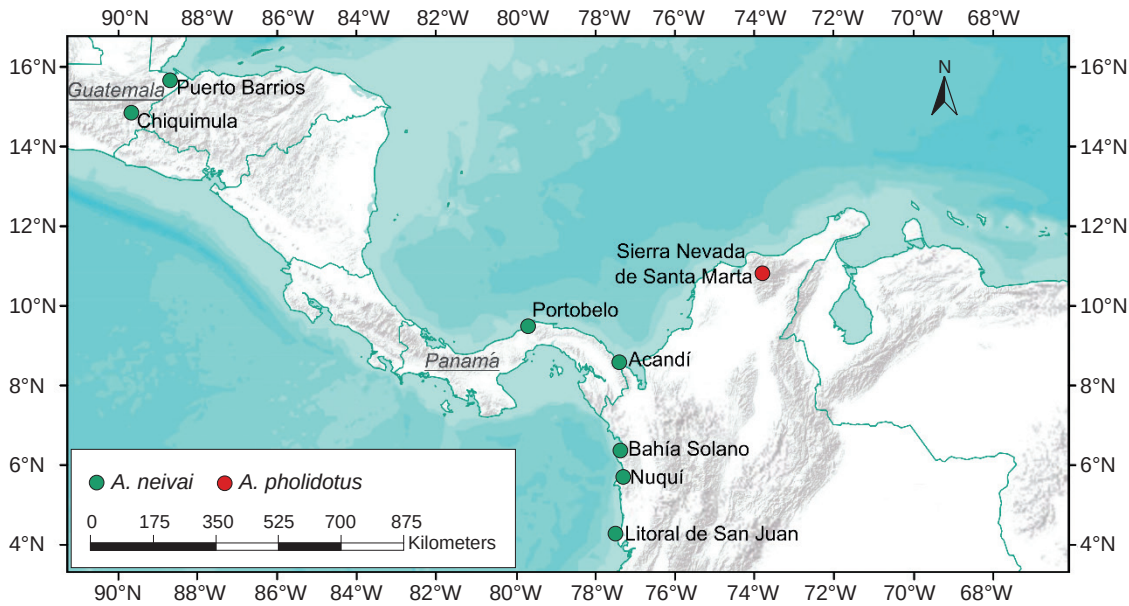


Figure 1. Collection localities for *A. neivai* and *A. pholidotus*

Table 1. Locality collection data for *A. neivai* and *A. pholidotus*

Species	Locality	Coordinates (Latitude/Longitude)	Altitude (m.a.s.l.)[1]
A. neivai	Acandí, Colombia (ACA)	8°34'39.81"N; 77°23'56.31"W	200
A. neivai	Bahía Solano, Colombia (BAH)	6°21'40.81"N; 77°21'23.89"W	32
A. neivai	Nuquí, Colombia (NUQ)	5°41'24.1"N; 77°15'16.7"W	26
A. neivai	Litoral de San Juan, Colombia (LIT)	4°16'14.1"N; 77°29'34.3"W	8
A. neivai	Portobelo, Panamá (POR)	9°29'59.4"N; 79°41'30.96"W	16
A. neivai	Puerto Barrios, Guatemala (PUE)	15°40'23.34"N; 88°41'27.96"W	912
A. neivai	Chiquimula, Guatemala (CHI)	14°50'48.60"N; 89°40'36"W	1,743
A. pholidotus	Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia (MAG)	11°5'48.0"N; 74°4'33.8"W	1,689

[1] Meters above sea level

Consensus sequences were assembled using Geneious 6.0 (37). Sequences were checked against available records in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) using the BLAST program (38). In addition, the sequences were verified for possible mitochondrial copies at the nucleus (NUMT), following the procedure suggested by Hlaing, *et al*. (39). The sequences of each region were aligned using Clustal X 2 (40) and included reference sequences of *A. albitarsis* (NC_020662) from NCBI.

The utility of this region was first assessed by identifying polymorphic sites supporting variants between specimens of *A. neivai* with other specimens from the subgenus *Kerteszia* and *A. albitarsis* (subgenus *Nyssorhynchus*) using DnaSP 5 (41). Then, *tRNASer* secondary structures for each variant were modeled using the RNA Fold package available in Vienna RNA 2.0 (42). Parameters were based on Mathews, *et al*. (43) using minimum free energy and partition, and no GU pairs at the end of helices, allowing dangling energies on both sides of the helix at 37 °C. The phylogenetic signal of this region was estimated using maximum parsimony (MP) with bootstrap resampling using 100,000 replicates through MEGA 7 (44), and a maximum likelihood (ML) with bootstrap support of 1,000 replicates. A Generalized Time Reversible model-GTR (45) was implemented using PhyML (46), and Bayesian inference (BI) under GTR model, assuming relaxed clock rates and Yule speciation process for BI (47) using BEAST 2.4 (48).

Results

Adults from *A. neivai*, including topotypic specimens from Portobelo (Panamá), were identified based on the following set of characters from (33):

mesanepimeron with an upper row seta (figure 2A), abdominal terguites I to IV without dark decumbent scales (figure 2B), acrostical area without white setae (figure 2C), and scale patterns on hind tarsomers (figure 2D). Additionally, specimens from immature stages were identified using the VIth abdominal segment and C setae from VIIth abdominal segment described in (32). No variability for the two immature specimens of *A*. *pholidotus* was observed.

The entire set of specimens produced a total of 36 sequences (table 2): 34 for *A. neivai* and two for *A. pholidotus*. Consequently, the amplified fragment of 411 bp consisted of 304 bp for *Cytb*, 68 bp for *tRNASer*, 25 bp for IG1, and 11 bp for *ND1*. Among them, 51 polymorphisms were identified for *Cytb*, six for *tRNASer* (including 2 indels), eight for IG1 (including 5 indels) and four for *ND1*.

Three variant secondary structures were associated with *tRNASer* polymorphisms (table 3). The first two structures (*A* and *B*) were found with *A. neivai* specimens, and the other (*C*) was found in *A. pholidotus*. In the *A. neivai* variants, the only difference is located at the dihydrouridine loop (*DHU)* as a result of a base substitution (U → C) (figure 3). When comparing *A. neivai* and *A. pholidotus* further differences were evident, including a length difference in the *DHU* loop as a consequence of an adenine insertion, followed by a transversion in *A. pholidotus*. All the remaining differences between *A*. *neivai* and *A*. *pholidotus* consisted of transversions in the pseudouridine loop (*TψC)* as synonymous substitutions detected in *A. pholidotus* (A → U, A → U and U → A).

The intergenic spacer (IG1) between *tRNASer* and *ND1* exhibited differences in length. A larger intergenic spacer was present in most of the specimens of *A*. *neivai* (24-25 bp), in contrast to *A. pholidotus* (20 bp) and *A*. *albitarsis* (18). The nucleotide variability in this region for *A. neivai* consisted of four variants, base substitutions found in variants 1 to 3, and an insertion on position 373 for variant 4 (Chiquimula, Guatemala). The same insertion was found in *A. pholidotus* (figure 4).

The comparison of three different approaches (MP, ML and IB) revealed similar patterns. One group with unresolved specimens for the majority of localities and another group including specimens from Panamá and Guatemala (figure 5). The overall pattern of nucleotide substitution estimated by ML across the *Cytb-tRNASer*-IG1-*ND1* regions recovered from several trees revealed phylogenetic

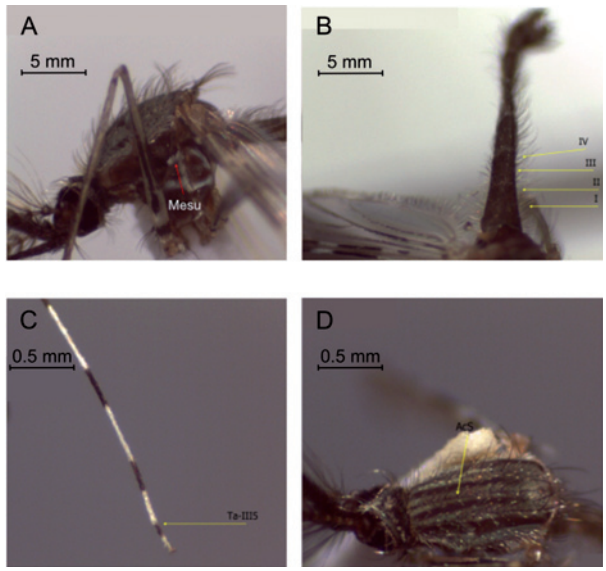


Figure 2. Diagnostic characters used for the identification of *A. neivai* as described by Harrison, *et al*. (33). **A.** Detail of mesanepimeron (Mesu) with upper setae. **B.** Detail of abdominal segments I to IV (1-IV), without dark decumbent scales. **C.** Detail of scale patterns in hind tarsomer (Ta-III5). **D.** Detail of acrostical area (AcS), without white scales

signal for the *Cytb* fragment and *tRNASer* gene (figure 5b). Equivalent groupings based on trees that included both fragments (figure 6a and 6b), were evident in specimens of *A. pholidotus* from Colombia and in *A. neivai* from Central America (Panamá and Guatemala localities). In contrast, when these regions were excluded, leaving only the IG1-*ND1* fragment (figure 6c), the relationships between *A. neivai* specimens in the Colombian localities and those from Central America were impossible to resolve due to the presence of polytomies.

Discussion

Phylogenetic signal is the tendency of closely related species to resemble one another (49). It is also a property of stochastic evolution along a hierarchical tree, depending on sample size, mutational rate and branch length (50). Therefore, testing the phylogenetic signal of a molecular marker is essential for phylogeny reconstruction of closely related and cryptic species, before proposing evolutionary patterns for biological entities or delimiting species based on trees (50).

One method for estimating the phylogenetic signal is tree topology comparison using several methods of analysis. For DNA-based matrices, ML and BI are often suggested over MP because they use an explicit model of evolution, have a consistent

Table 2. Specimen collection data for *A. neivai* and *A. pholidotus*

Specimen	Species	Habitat	Collection method[2]	Stage[3]	Specimen voucher[4]	DNA sequence accession[5]
AN-ACA-01	*A. neivai*	Forest	Mp.	F		KX303870
AN-ACA-02	*A. neivai*	Forest	Mp.	F		KX303871
AN-BAH-01	*A. neivai*	Pasture	Mp.	F		KX303872
AN-BAH-02	*A. neivai*	Pasture	Mp.	M		KX303873
AN-BAH-05	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303876
AN-BAH-06	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303877
AN-NUQ-01	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303886
AN-NUQ-02	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303887
AN-NUQ-03	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303888
AN-NUQ-08	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303893
AN-NUQ-09	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303890
AN-NUQ-12	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	M	NC 26136	KX303891
AN-NUQ-13	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	M	NC 26137	KX303892
AN-NUQ-14	*A. neivai*	Mangrove	Mp.	F		KX303897
AN-LIT-01	*A. neivai*	Forest	Mp.	F		KX303881
AN-LIT-02	*A. neivai*	Forest	Sh.	F		KX303882
AN-LIT-03	*A. neivai*	Forest	Sh.	F		KX303883
AN-LIT-04	*A. neivai*	Forest	Sh.	F	NC_26433	KX303889
AN-LIT-05	*A. neivai*	Forest	Sh.	F		KX303885
AN-POR-01	*A. neivai*	Forest	Mp.	L		KX303894
AN-POR-02	*A. neivai*	Dispersed housing	Mp.	L		KX303895
AN-POR-03	*A. neivai*	Dispersed housing	Mp.	L		KX303896
AN-POR-04	*A. neivai*	Dispersed housing	Mp.	L		KX303903
AN-POR-05	*A. neivai*	Dispersed housing	Mp.	L		KX303898
AN-POR-06	*A. neivai*	Dispersed housing	Mp.	L		KX303899
AN-POR-07	*A. neivai*	Edge of disturbed forest	Mp.	F		KY498627
AN-PUE-01	*A. neivai*	Forest	Mp.	F		KX303900
AN-PUE-02	*A. neivai*	Forest	Mp.	F		KX303901
AN-PUE-03	*A. neivai*	Forest	Mp.	M		KX303902
AN-PUE-04	*A. neivai*	Forest	Mp.	F		KX303904
AN-CHI-01	*A. neivai*	Edge of disturbed forest	Mp.	F		KX303878
AN-CHI-02	*A. neivai*	Edge of disturbed forest	Mp.	F		KX303879
AN-CHI-03	*A. neivai*	Forest	Mp.	F		KX303880
AN-CHI-04	*A. neivai*	Forest	Mp.	A		KX303884
MAG001A	*A. pholidotus*	Forest	Mp.	L		KX303906
MAG001B	*A. pholidotus*	Forest	Mp.	L		KY498628

[2] Collection method: Manual pipetting (Mp.), Shannon trap (Sh.)
[3] Stage used for specimen identification/DNA sequencing: L (larvae), F (female), M (male)
[4] Specimen voucher deposited at Museo Entomológico Francisco Luis Gallego
[5] Accession records at the National Center for Biotechnology Information

approach to parameter estimation problems, have lower variance problems, do not violate many of the assumptions of the evolutionary model, and better account for branch length (51). In addition, ML can be more accurate than BI due to possible long branch attraction in trees (52,53). Our results suggest a consistent topology from both approaches (ML and BI) but a weak phylogenetic signal to differentiate Central America *A. neivai* specimens from those in Colombia.

For anopheline phylogeny, the use of a 460 bp fragment of *Cytb* usually lacks meaningful phylogenetic signal due to extreme conservation at the protein level and rapid saturation of synonymous positions for reconstructing the phylogeny among eight subgenera in *Anopheles* (*Anopheles, Cellia, Nyssorhynchus, Kerteszia, Stethomyia, Bironella* and *Chagasia*) (13). However, the use of a fragment of this gene, as with additional loci (*RNASer*-IG1-*ND1*) in this work, improved the estimation of tree topology in *A. neivai*.

In addition, transfer RNA is one of the most central and ancient molecules of the cell (54). The evolution of this molecule supports the hypothesis of accretion of its structural parts where acceptor arm and *TΨC* loop are known to be more ancient than the anticodon, the *DHU* and the variable loop (55). Because of its importance in cell protein biosynthesis, the tRNA secondary structure is highly conserved at *DHU* and *TΨC* loops (56). However,

Table 3. Secondary structure (*tRNASer*) and intergenic spacer (IG1) variants for *A. neivai* and *A. pholidotus*

Species	Locality	Specimen code	*tRNASer* variants	IG1variants
A. neivai	Acandí, Colombia	AN-ACA-01	*A*	*3*
A. neivai	Acandí, Colombia	AN-ACA-02	*A*	*3*
A. neivai	Bahía Solano, Colombia	AN-BAH-01	*B*	*2*
A. neivai	Bahía Solano, Colombia	AN-BAH-04	*B*	*1*
A. neivai	Bahía Solano, Colombia	AN-BAH-05	*B*	*3*
A. neivai	Bahía Solano, Colombia	AN-BAH-06	*B*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-01	*A*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-02	*A*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-03	*A*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-08	*B*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-09	*B*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-12	*B*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-13	*B*	*3*
A. neivai	Nuquí, Colombia	AN-NUQ-14	*B*	*3*
A. neivai	Litoral de San Juan, Colombia	AN-LIT-01	*B*	*3*
A. neivai	Litoral de San Juan, Colombia	AN-LIT-02	*B*	*3*
A. neivai	Litoral de San Juan, Colombia	AN-LIT-03	*B*	*1*
A. neivai	Litoral de San Juan, Colombia	AN-LIT-04	*B*	*1*
A. neivai	Litoral de San Juan, Colombia	AN-LIT-05	*B*	*3*
A. neivai	Portobelo, Panamá	AN-POR-01	*B*	*1*
A. neivai	Portobelo, Panamá	AN-POR-02	*B*	*1*
A. neivai	Portobelo, Panamá	AN-POR-03	*B*	*1*
A. neivai	Portobelo, Panamá	AN-POR-04	*B*	*1*
A. neivai	Portobelo, Panamá	AN-POR-05	*B*	*1*
A. neivai	Portobelo, Panamá	AN-POR-06	*B*	*1*
A. neivai	Portobelo, Panamá	AN-POR-07	*B*	*1*
A. neivai	Puerto Barrios, Guatemala	AN-PUE-01	*B*	*3*
A. neivai	Puerto Barrios, Guatemala	AN-PUE-02	*B*	*3*
A. neivai	Puerto Barrios, Guatemala	AN-PUE-03	*B*	*1*
A. neivai	Puerto Barrios, Guatemala	AN-PUE-04	*B*	*1*
A. neivai	Chiquimula, Guatemala	AN-CHI-01	*B*	*3*
A. neivai	Chiquimula, Guatemala	AN-CHI-02	*B*	*4*
A. neivai	Chiquimula, Guatemala	AN-CHI-03	*B*	*4*
A. neivai	Chiquimula, Guatemala	AN-CHI-04	*B*	*4*
A. pholidotus	Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia	MAG001A	*C*	*5*
A. pholidotus	Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia	MAG001B	*C*	*5*

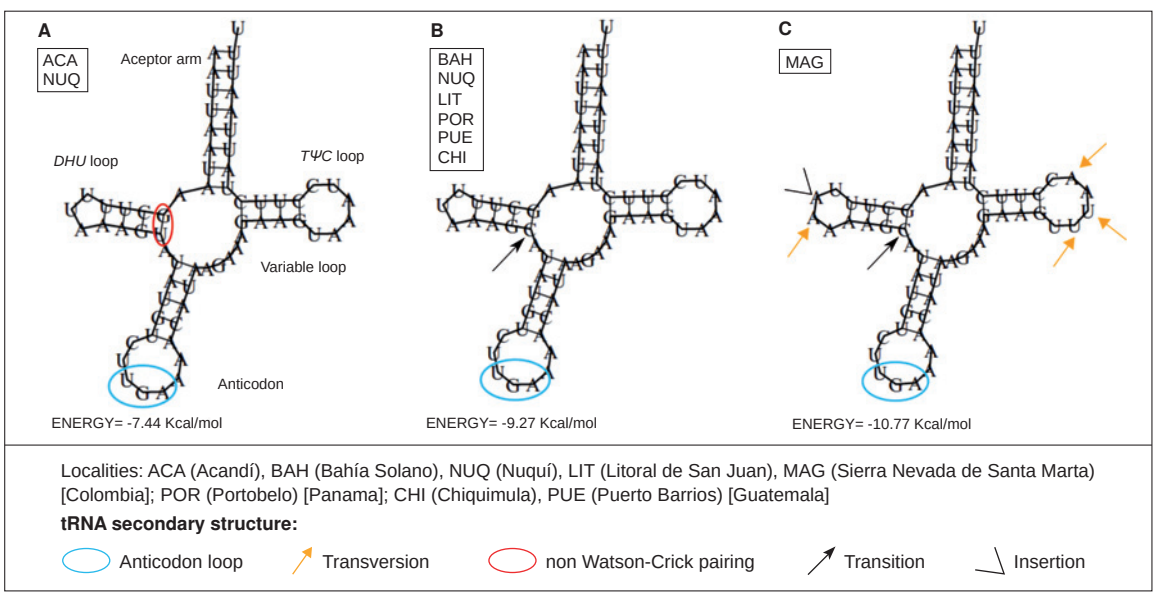
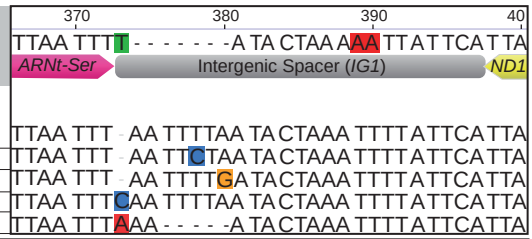


Figure 3. *tRNASer* secondary structure models. **A.** *A. neivai* (variant *A).* **B.** *A. neivai* (variant *B*). **C**. *A. pholidotus* (variant *C*)

Anopheles albitarsis (NCBI: NC_020662)	
Variant	**Locality**
A. neivai (Var. 1)	BAH, LIT, POR, PUE
A. neivai (Var. 2)	BAH
A. neivai (Var. 3)	ACA, BAH, NUQ, LIT, PUE, CHI
A. neivai (Var. 4)	CHI
A. pholidotus (Var. 5)	MAG



Localities: ACA (Acandí), BAH (Bahía Solano), NUQ (Nuquí), LIT (Litoral de San Juan), MAG (Sierra Nevada de Santa Marta) [Colombia]; POR (Portobelo) [Panama]; CHI (Chiquimula), PUE (Puerto Barrios) [Guatemala]

Figure 4. Polymorphic sites of *A. neivai* and *A .pholidotus* in the IG1 region

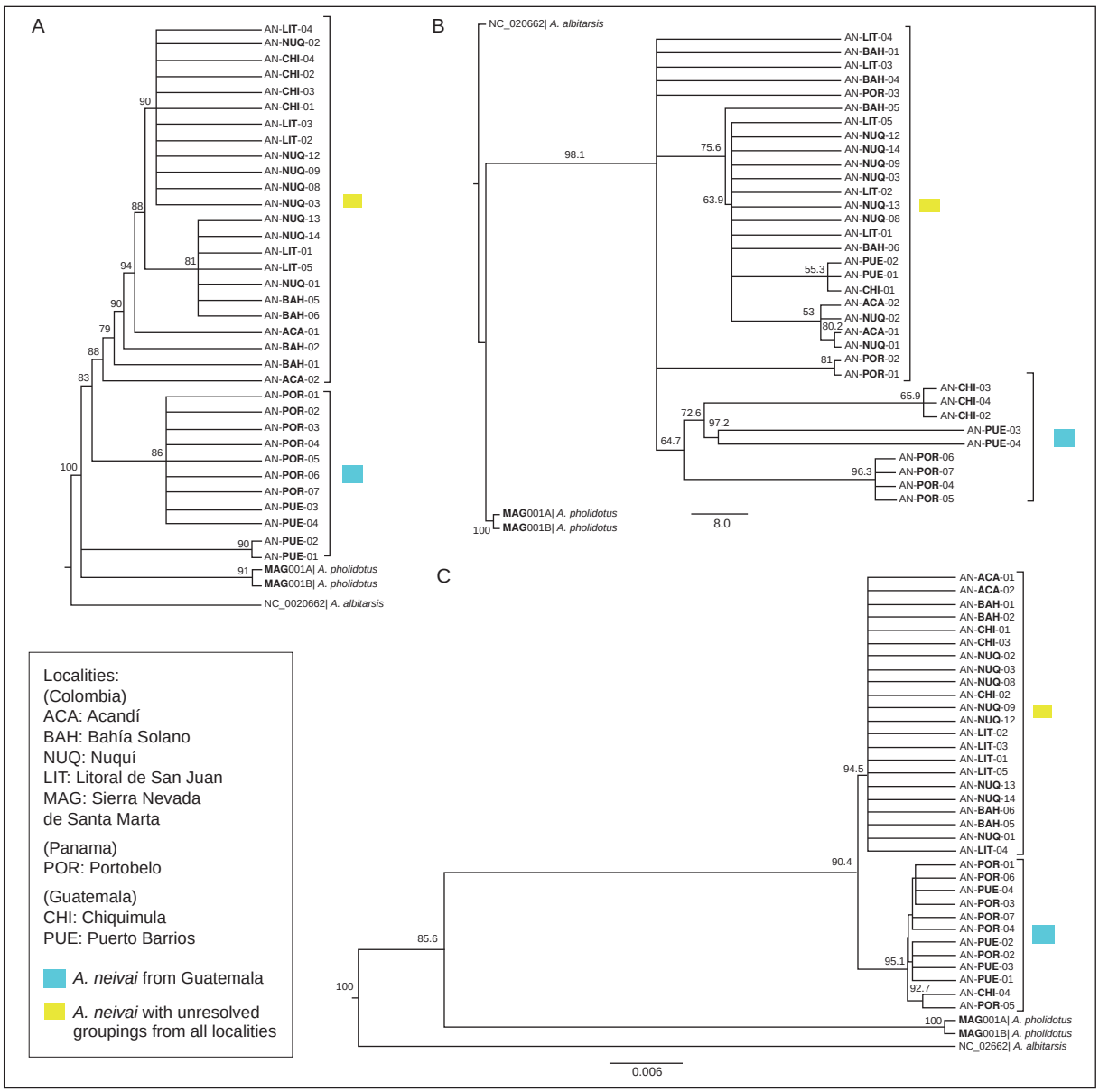


Figure 5. Comparison of tree topologies for *A. neivai* based on several different analyses for *Cytb-tRNASer*-IG1-*ND1.* **A.** Maximum parsimony. **B.** Maximum likelihood (GTR model). **C.** Bayesian inference (GTR model). Bootstrap branch support for each group is provided for maximum likelihood and parsimony. Posterior probability for each node is provided for Bayesian inference.

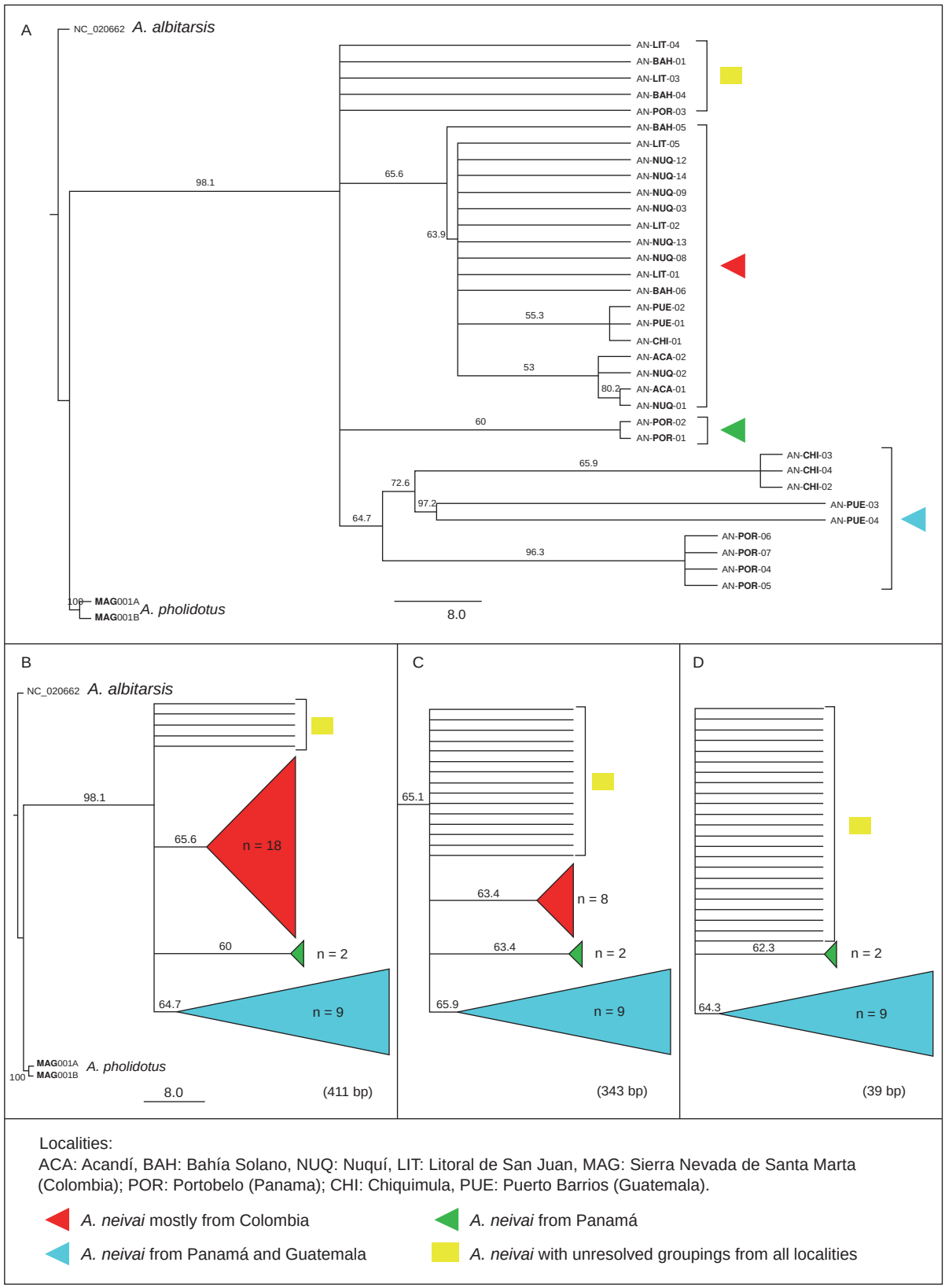


Figure 6. Comparison of tree topologies for *A. neivai* based on different fragments. **A.** *Cytb-tRNASer*-IG1-*ND1*. **B.** *tRNASer*-IG1-*ND1*. **C.** IG1-*ND1*. **D.** *ND1*.

polymorphisms at stems caused by a switch from a Watson-Crick base pairing (A-U, or G-C) to non-Watson-Crick pairing (A-C or G-U), could affect the fitness of individuals (57). Our results from *tRNASer* secondary structure revealed there is a switch from G-C (variant *B) to* G-U (variant *A*) at the *DHU* stem. In evolving lineages, the fixation at population level of intermediates from this switch phenomenon is rare (56). However, the switch from Watson-Crick to non-Watson-Crick base pairing can compromise the development of bristle and decrease fecundity in other insects as reported in *Drosophila* (58).

The use of this region in anophelines or other culicids is scarce, despite the efficacy of *tRNASer* for resolving cryptic species in insects such as sandflies *Lutzomyia pia* and *L. tihuilensis* (Diptera: Psychodidae) (59) and differentiation among satyr butterflies (29). From our results, the polymorphism in *A. neivai* from a single transition occurring at the *DHU* stem cannot be considered different biological entities but instead a putative ancestral variant (*B*) and a derived intermediate form (variant *A*), as variant *B* shares the same Watson-Crick pairing at *DHU* stem with variant *C* from *A. pholidotus*.

In insect mitogenomes, a small conserved region between *tRNASer* and *ND1 has* been reported previously (35,60,61). For anophelines and other insects the size of this region can vary as result of insertions and deletions. The phylogenetic utility of IG1for resolving species complexes was demonstrated when comparing mutations (insertions) between *A. gambiae* and *A. quadrimaculatus* (62). However, the current results suggest that substitution patterns and indels in *IG1* make it unsuitable for phylogenetic reconstruction and molecular taxonomy as consequence of length (25 bp) and low polymorphism. In addition, the motif (ATACTAA) for *A. neivai* and *A. pholidotus* corresponds to the binding site of the transcription termination peptide (MtTERM), signifying the end of the major strand coding region (63,64) shared among insect mtDNA (63).

Currently, the use of integrative taxonomy is multifaceted, using morphological and genetic evidence for the delimitation of the biological entities and integrating different perspectives, such as molecular systematics, phylogeography, comparative biology, and population genetics (65). From our perspective, the utility of the *Cytb-SertRNA*-IG1-*ND1* region revealed interesting polymorphisms in *A. neivai* from a wide geographic range from Guatemala, the type locality in Panamá, the Pacific coast and the Urabá gulf in Colombia. However, the variations were not considered adequate to uncover cryptic species. Several variants may be adaptive and appear to be distributed in relation to altitude (Chiquimula, Guatemala) and geographic distribution (comparing Panamá, Guatemala and Colombia). The significance of these genetic variants requires further verification by additional studies on biting behavior, human affinity, mitogenomics and population dynamics.

Acknowledgments

We would like to thank Natalia Molina for her help on processing part of the specimens from Litoral de San Juan; Diego Puerta and Jovany Barajas for their collaboration during the collecting trips. Special thanks go to Dr. Paula Marcet, for her help and assistance for sequencing DNA samples.

Conflicts of interest

All authors report no conflict of interest and state their responsibility for the content and writing of this article.

Financing

We would like to thank Colciencias (567-Ph.D. grant), Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, and PECET – Universidad de Antioquia, for funding the collecting surveys, reagents and equipment employed in this research.

References

1. **Zavortink TJ.** Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. Contrib Am Entomol Inst. 1973;9:1-54.

2. **Escovar J, González R, Quiñones ML.** Anthropophilic biting behaviour of *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab associated with Fishermen's activities in a malaria-endemic area in the Colombian Pacific. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:1057-64. https://doi.org/ 10.1590/0074-0276130256

3. **Murillo C, Jaramillo C, Quintero J, Suárez M.** Biología de *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. IV Estructura etárea y transmisión de malaria. Rev Saúde Pública. 1989;23:363-7. https://doi.org/10.1590/S0034-89101989000500001

4. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: claves y notas de distribución. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2009. p. 260.

5. **Gutiérrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, *et al*.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. Acta Trop. 2008; 107:99-105. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.019

6. **Murillo C, Astaiza R, Fajardo P.** Biología de *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera:Culicidae) en la Costa Pacífica de Colombia. III Medidas de luminosidad y el comportamiento de picadura. Rev Saúde Pública. 1988;22: 109-12. https://doi.org/10.1590/S0034-89101988000200006

7. **Astaiza R, Murillo C, Fajardo P.** Biología de *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la Costa Pacífica de Colombia. II Fluctuación de la población adulta. Rev Saúde Pública. 1988;22:101-8. https://doi.org/10.1590/S0034-89101988000200005

8. **Collins FH, Paskewitz SM.** A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol Biol. 1996;5:1-9. https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00034.x

9. **Rosero DA, Jaramillo LM, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM.** Genetic diversity of *Anopheles triannulatus*s. l. (Diptera: Culicidae) from Northwestern and Southeastern Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:910-20. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0285

10. **Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE.** Cryptic species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence between random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA *COI* gene. Ann Entomol Soc Am. 2005;98:908-17. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0908:CSITAN]2.0.CO;2

11. **Montoya-Lerma J, Solarte Y, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, *et al*.** Malaria vector species in Colombia: A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:223-38. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028

12. **Linton Y-MM.** Mosquito Barcoding Initiative. The first barcode release paper. Third International Barcode of Life Conference. México: Consortium for the Barcoding of Life-CBOL. – 2009. Accessed: January 15th, 2017. Available from: https://vimeo.com/8996184

13. **Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ.** Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): Implications for phylogeny reconstruction. Mol Phylogenet Evol. 2001;18:479-87. https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0894

14. **Freitas LA, Russo CA, Voloch CM, Mutaquiha OC, Marques LP, Schrago CG.** Diversification of the genus *Anopheles* and a neotropical clade from the late Cretaceous. PLoS One. 2015;10:e0134462. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134462

15. **Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TM, Nagaki SS, Sant'Ana DC, *et al*.** Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). PLoS One. 2013;8:e54063. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054063

16. **Ruiz-López F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, *et al*.** DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. Parasit Vectors. 2012;5:44. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-44

17. **Moreno M, Bickersmith S, Harlow W, Hildebrandt J, McKeon SN, Silva-do-Nascimento TF, *et al*.** Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. Parasit Vectors. 2013;6:47. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-47

18. **Hoy AM.** Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications. 3rd edition. Boston, MA: Academic Press; 2013. p. 364.

19. **Rubinoff D, Holland BS.** Between two extremes: Mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. Syst Biol. 2005;54: 952-61. https://doi.org/10.1080/10635150500234674

20. **Hurst GD, Jiggins FM.** Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. Proc R Soc B Biol Sci. 2005;272:1525-34. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3056

21. **Norris LC, Norris DE.** Phylogeny of anopheline (Diptera: Culicidae) species in southern Africa, based on nuclear and mitochondrial genes. J Vector Ecol. 2015;40:16-27. https://doi.org/10.1111/jvec.12128

22. **Harbach RE.** The phylogeny and classification of *Anopheles*. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka: InTech; 2013.

23. **López-Rubio A, Suaza-Vasco J, Marcet PL, Ruiz-Molina N, Cáceres L, Porter C, Uribe S.** Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia. Zootaxa. 2016;4175:377-89. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4175.4.7

24. **Danforth BN, Lin CP, Fang J.** How do insect nuclear ribosomal genes compare to protein-coding genes in phylogenetic utility and nucleotide substitution patterns? Syst Entomol. 2005;30:549-62. https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00305.x

25. **Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ.** Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: Insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. Syst Biol. 2001;50:540-56. https://doi.org/10.1080/10635150119931

26. **Vivero RJ, Contreras-Gutiérrez MA, Bejarano EE.** Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. Biomédica. 2007;27:429-38. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i3.205

27. **Yona AH, Bloom-Ackermann Z, Frumkin I, Hanson-Smith V, Charpak-Amikam Y, Feng Q, *et al*.** tRNA genes rapidly change in evolution to meet novel translational demands. Elife. 2013;2:e01339. https://doi.org/10.7554/eLife.01339.001

28. **Kumazawa Y, Nishida M.** Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. J Mol Evol. 1993;37:380-98. https://doi.org/10.1007/BF00178868

29. **Marín MA, López A, Uribe SI.** Interspecific variation in mitochondrial serine transfer RNA (UCN) in Euptychiina butterflies (Lepidoptera: Satyrinae): Structure and alignment. Mitochondrial DNA. 2012;23:208-15. https://doi.org/10.3109/19401736.2012.668895

30. **Keller A, Förster F, Müller T, Dandekar T, Schultz J, Wolf M.** Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. Biol Direct. 2010;5:4. https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-4

31. **Pecor J, Gaffigan T.** Collecting, rearing, preserving, mounting and shipping techniques for mosquitoes. Walter Reed Biosystematics Unit. 1997. Accessed: January 4th, 2017. Available from: http://www.wrbu.org/about/techniques.html

32. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: claves y notas de distribución. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2009. p. 260.

33. **Harrison BA, Ruiz-López F, Falero GC, Savage HM, Pecor JE, Wilkerson RC.** *Anopheles* (*Kerteszia*) *lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. Zootaxa. 2012;3218:1-17.

34. **Uribe SI, Porter CH, Vélez ID.** Amplificación y obtención de secuencias de rRNA mitocondrial en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae), vectores de leishmaniosis. Rev Colomb Entomol. 1998;23:177-85.

35. **Ready PD, Day JC, de Souza A, Rangel EF, Davies CR.** Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. Bull Entomol Res. 1997;87:187-95. https://doi.org/10.1017/S0007485300027346

36. **Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P.** Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann Entomol Soc Am. 1994;87:651-701. https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651

37. **Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, *et al*.** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012;28:1647-9. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199

38. **Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL.** NCBI BLAST: A better web interface. Nucleic Acids Res. 2008;36:W5-9. https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkn201

39. **Hlaing T, Tun-Lin W, Somboon P, Socheat D, Setha T, Min S, *et al*.** Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: Implications for past and future population genetic studies. BMC Genet. 2009;10:11. https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-11

40. **Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, *et al*.** Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23:2947-8. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404

41. **Librado P, Rozas J.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25:1451-2. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187

42. **Lorenz R, Bernhart SH, Höner-zuSiederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, *et al*.** ViennaRNA Package 2.0. Algorithms Mol Biol. 2011;6:26. https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26

43. **Mathews DH, Disney MD, Childs JL, Schroeder SJ, Zuker M, Turner DH.** Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:7287-92. https://doi.org/10.1073/pnas.0401799101

44. **Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016;33:1870-4. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

45. **Tavaré S.** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lect Math Life Sci. 1986;17:57-86.

46. **Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol. 2010;59:307-21. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010

47. **Yule GU.** A mathematical theory of evolution based on the conclusions of Dr. J.C. Willis, F.R.S. J R Stat Soc. 1925;88:433-6. https://doi.org/10.1098/rstb.1925.0002

48. **Bouckaert RR, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, *et al*.** BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLoS Comput Biol. 2014;10:e1003537. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537

49. **Münkemüller T, Lavergne S, Bzeznik B, Dray S, Jombart T, Schiffers K, *et al*.** How to measure and test phylogenetic signal. Methods Ecol Evol. 2012;3:743-56. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00196.x

50. **Blomberg SP, Garland T, Ives AR.** Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioural traits are more labile. Evolution (N Y). 2003;57:717-45. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x

51. **Felsenstein J.** Inferring Phylogenies. Sunderland: Sinauer Associates; 2004. p. 664.

52. **Kolaczkowski B, Thornton JW.** Long-branch attraction bias and inconsistency in Bayesian phylogenetics. PLoS One. 2009;4:e7891. https://doi.org10.1371/journal.pone.0007891

53. **Susko E.** Bayesian long branch attraction bias and corrections. Syst Biol. 2015;64:243-55. https://doi.org10.1093/sysbio/syu099

54. **Caetano-Anollés G, Sun FJ.** The natural history of transfer RNA and its interactions with the ribosome. Front Genet. 2014;5:1-5. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00127

55. **Sun FJ, Caetano-Anollés G.** The origin and evolution of tRNA inferred from phylogenetic analysis of structure. J Mol Evol. 2008;66:21-35. https://doi.org/10.1007/s00239-007-9050-8

56. **Meer M V, Kondrashov AS, Artzy-Randrup Y, Kondrashov FA.** Compensatory evolution in mitochondrial tRNAs navigates valleys of low fitness. Nature. 2010;464:279-82. https://doi.org/10.1038/nature08691

57. **Zhang J, Ferré-D'Amaré A.** The tRNA elbow in structure, recognition and evolution. Life. 2016;6:3. https://doi.org/10.3390/life6010003

58. **Meiklejohn CD, Holmbeck MA, Siddiq MA, Abt DN, Rand DM, Montooth KL.** An incompatibility between a mitochondrial tRNA and its nuclear-encoded trnasynthetase compromises development and fitness in *Drosophila*. PLoS Genet. 2013;9:e1003238. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003238

59. **Pérez-Doria A, Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID.** Molecular evidence confirms the taxonomic separation of *Lutzomyia*

tihuiliensis from *Lutzomyia pia* (Diptera: Psychodidae) and the usefulness of pleural pigmentation patterns in species identification. J Med Entomol. 2008;45:653-9. https://doi.org/10.1093/jmedent/45.4.653

60. **Dotson EM, Beard CB.** Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. Insect Mol Biol. 2001;10:205-15. https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2001.00258.x

61. **Kim I, Lee EM, Seol KY, Yun EY, Lee YB, Hwang JS, *et al.*** The mitochondrial genome of the Korean hairstreak, *Coreana raphaelis* (Lepidoptera: Lycaenidae). Insect Mol Biol. 2006;15:217-25. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00630.x

62. **Beard CB, Hamm DM, Collins FH.** The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. Insect Mol Biol. 1993;2:103-24. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x

63. **Cameron SL, Whiting MF.** The complete mitochondrial genome of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths. Gene. 2008;408:112-23. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.023

64. **Sheffield NC, Song H, Cameron SL, Whiting MF.** A comparative analysis of mitochondrial genomes in coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. Mol Biol Evol. 2008;25:2499-509. https://doi.org/ 10.1093/molbev/msn198

65. **Dayrat B.** Towards integrative taxonomy. Biol J Linn Soc. 2005;85:407-15. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x

Biomédica 2017;37(Supl.2):155-66
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3467

ARTÍCULO ORIGINAL

Vigilancia virológica de *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Stegomyia) albopictus* como apoyo para la adopción de decisiones en el control del dengue en Medellín

Juliana Pérez-Pérez[1], William H. Sanabria[2], Carolina Restrepo[2], Raúl Rojo[2], Enrique Henao[2], Omar Triana[3], Ana María Mejía[3], Sandra M. Castaño[3], Guillermo L. Rúa-Uribe[1]

[1] Grupo de Entomología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Secretaría de Salud de Medellín, Medellín, Colombia
[3] Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. El dengue en Colombia representa un grave problema de salud y, dado que no existe un tratamiento efectivo para la enfermedad y la vacuna no se ha aprobado en todos los países, se deben fortalecer acciones para mitigar su impacto mediante el control de *Aedes aegypti*, el mosquito vector. La vigilancia en el país se hace con base en los índices entomológicos y en la notificación de casos, la cual es frecuentemente tardía y por ello conduce a falta de oportunidad en las intervenciones. La detección viral en mosquitos urbanos mediante técnicas moleculares proporciona información entomológica más precisa para la adopción de decisiones.
Objetivo. Reportar los resultados de la vigilancia virológica de especímenes de *Aedes* spp. recolectados durante actividades entomológicas rutinarias de la Secretaría de Salud de Medellín.
Materiales y métodos. Los ejemplares se recolectaron durante dos periodos, en cada uno de los cuales se seleccionaron 18 viviendas alrededor de cada una de las 250 trampas para larvas dispuestas para la vigilancia entomológica, así como 70 instituciones educativas y 30 centros de salud. Los ejemplares se identificaron y se conformaron grupos para la detección viral mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Se calculó la tasa mínima de infección y el índice de infestación en adultos.
Resultados. Se recolectaron 1.507 mosquitos, 10 de los cuales eran *Ae. albopictus.* De los 407 grupos conformados, 132 (uno de ellos de *Ae. albopictus*) fueron positivos, y 14,39 % correspondió a machos de *Ae. aegypti.* La tasa mínima de infección para *Ae. aegypti* fue de 120,07 y 69,50 en el primer y segundo períodos, respectivamente, y el índice de infestación en adultos fue mayor en las instituciones educativas (23,57 %).
Conclusión. Mediante la RT-PCR se detectaron la infección natural y la transmisión vertical del virus del dengue en *Ae. aegypti* y en *Ae. albopictus*. Se propone considerar la incorporación de estas técnicas moleculares en los programas de vigilancia y control de las arbovirosis en el país.

Palabras clave: *Aedes*; virus del dengue; vectores de enfermedades; vigilancia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3467

Virological surveillance of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* as support for decision making for dengue control in Medellín

Introduction: Dengue represents an important public health problem in Colombia. No treatment is available and the vaccine has not been approved in all countries, hence, actions should be strengthened to mitigate its impact through the control of *Aedes aegypti*, the vector mosquito. In Colombia, surveillance is done using entomological indexes and case notification, which is usually informed late, leading to untimely interventions. Viral detection in urban mosquitoes using molecular techniques provides more accurate entomological information for decision-making.
Objective: To report results of virological surveillance in *Aedes* specimens collected during routine entomological activities of the *Secretaría de Salud de Medellín*.
Materials and methods: Specimens were collected during two periods in each of which we selected 18 dwellings around each one of the 250 larva traps arranged for mosquitoe surveillance, as well

Contribución de los autores:
Juliana Pérez-Pérez: diseño de la metodología de muestreo, identificación taxonómica y procesamiento de muestras
William H. Sanabria, Carolina Restrepo, Raúl Rojo, Enrique Henao: diseño de la metodología de muestreo
Omar Triana, Ana María Mejía y Sandra M. Castaño: procesamiento de las muestras
Guillermo L. Rúa-Uribe: diseño de la metodología de muestreo y verificación taxonómica
Todos los autores participaron en el análisis de la información y la escritura del manuscrito.

as 70 educational institutions and 30 health centers. Specimens were identified morphologically, and divided in pools for viral detection using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). We calculated the minimum infection rate and the adult infestation index for each group.
Results: We collected 1,507 adult mosquitoes, 10 of which were identified as *A. albopictus.* Out of the 407 pools, 132 (one of them *Ae. albopictus*) were positive, and 14.39% were *A. aegypti* males. The minimum infection rates for *Ae. aegypti* were 120.07 and 69,50 for the first and second periods, respectively, and the adult infestation index was higher in educational institutions (23.57%).
Conclusions: Using RT-PCR we identified natural infectivity and vertical transmission of dengue virus in *A. aegypti* and *A. albopictus*. We suggest the use of molecular techniques in arbovirosis surveillance and control programs in Colombia.

Key words: *Aedes*; dengue virus; disease vectors; surveillance.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3467

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores de mayor impacto en la morbilidad, la mortalidad y las condiciones socioeconómicas de más de 3.900 millones de personas en riesgo en el mundo (1,2). La enfermedad es causada por el virus del dengue (DENV), miembro del género *Flavivirus*, del cual se conocen cuatro serotipos estrechamente relacionados (3). El virus es transmitido por la picadura de hembras de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) y *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (4,5), ambos presentes en Colombia (6).

En el país, el dengue representa un problema prioritario de salud pública debido a su elevada transmisión, a la circulación simultánea de los diferentes serotipos y a la presencia del vector en más de 90 % del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 msnm (7), aunque recientemente se reportó a una altura de 2.302 msnm en Bello, Antioquia (8). En el 2016, se registraron, aproximadamente, 104.000 casos de dengue y 60 muertes confirmadas por unidad de análisis en el país (9), datos que podrían ser muy superiores dado el subregistro que se estima para esta enfermedad (10).

Antioquia es el segundo departamento del país en cuanto a la notificación de casos de dengue (11) y, dadas las características ecoepidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad de Medellín, su capital (12), y al comportamiento endémico y epidémico del dengue allí, se la ha categorizado como una ciudad hiperendémica (13).

Correspondencia:
Juliana Pérez, Grupo de Entomología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D N° 62-29, laboratorio 321, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6061
jperezp1017@gmail.com

Recibido: 08/08/16; aceptado: 18/08/17

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el empleo de una vacuna contra el dengue en algunos países de Latinoamérica (14). Sin embargo, en Colombia no se ha iniciado este programa de inmunización, razón por la cual se hace necesario reforzar la implementación de la estrategia de gestión integrada (EGI) para la vigilancia, la prevención y el control del dengue propuesta por la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (15).

En el marco de dicha estrategia, la inteligencia epidemiológica es una herramienta crucial, pues integra la información de la vigilancia epidemiológica y del laboratorio (entomológica, virológica y serológica) como soporte de las intervenciones de salud pública en este campo.

La vigilancia epidemiológica del dengue en Colombia se basa principalmente en las notificaciones de los casos reportados por las llamadas unidades primarias generadoras de datos, y en los levantamientos de índices entomológicos. Sin embargo, algunas veces los casos se reportan tardíamente en el sistema, por lo cual las decisiones para el control de la enfermedad resultan inoportunas. Por otro lado, los índices entomológicos, diseñados para determinar el riesgo de transmisión (16), han demostrado ser poco precisos. En este sentido, se ha observado poca relación entre los índices larvarios y la producción de mosquitos adultos, los cuales son los responsables de la transmisión (17). Varios autores han determinado que más de 80 % de los adultos de *Aedes* spp. provienen de menos del 20 % de los depósitos (18-20), y señalan que los índices aédicos tradicionales no deben considerarse como indicadores del riesgo epidemiológico (19,20). Por ejemplo, en el 2010, durante la mayor epidemia de dengue registrada en Medellín, no se observó relación entre los índices entomológicos tradicionales y la incidencia de la enfermedad (21).

En este contexto, el empleo de técnicas moleculares para la detección del virus del dengue en mosquitos recolectados en campo se convierte en una estrategia que permite disponer de información entomológica de mayor precisión (6,22,23), la cual podría emplearse en un sistema de alerta temprana de apoyo a la adopción de medidas de control vectorial que mitiguen el impacto de la enfermedad.

Desde el 2015, la Secretaría de Salud de Medellín viene implementando la vigilancia virológica utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para la detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes* recolectados en áreas urbanas, la cual ha demostrado ser una herramienta de apoyo eficiente de los programas de prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores (ETV) en la ciudad. En el presente estudio se presentan los resultados más relevantes de este sistema de vigilancia virológica en mosquitos.

Materiales y métodos

Área de estudio

Medellín se encuentra situado en el valle de Aburrá, a 75°,34',05"O y 6°,13',55"N; su extensión es de 376,2 km^2 y la atraviesa de norte a sur el río Medellín. Topográficamente, la ciudad es un plano inclinado que desciende desde los 1.800 a los 1.500 msnm. La latitud y la altitud de la ciudad dan como resultado un clima subtropical subhúmedo, con una temperatura ambiental en la zona urbana que oscila entre los 16 y los 28 °C. Aunque no tiene estaciones, frecuentemente el comienzo y la mitad del año son periodos secos; durante el resto del año el clima es variable, pero con abundantes lluvias, lo que resulta en una precipitación media anual de 1.656 mm.

La ciudad cuenta con 16 comunas urbanas y cinco suburbanas. Exceptuando dos de las comunas suburbanas (Santa Elena y San Sebastián de Palmitas), cuyas características climáticas no permiten la supervivencia del vector, los mosquitos se recolectaron en toda la ciudad.

Recolección de mosquitos

La Secretaría de Salud de Medellín cuenta con un sistema de vigilancia del vector conformado por 250 trampas para larvas, las cuales se encuentran distribuidas uniformemente en toda la ciudad en una configuración basada en polígonos de Thiessen (figura 1). Los muestreos se hicieron durante dos periodos del 2016: febrero a marzo y mayo a junio. Para cada período de muestreo, se seleccionaron aleatoriamente 18 viviendas alrededor de cada una de las trampas, para un total de 4.500 viviendas. Además, se recolectaron mosquitos en 70 instituciones educativas y 30 centros de salud, seleccionados también aleatoriamente en cada período.

Se hizo búsqueda activa de ejemplares durante 15 minutos en cada lugar de muestreo, se recolectaron con un aspirador bucal y se almacenaron en tubos Falcon de 50 ml tapados con tela de tul, con el fin de transportarlos vivos hasta el Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad de Antioquia, donde se identificaron taxonómicamente siguiendo la clave morfológica de Rueda (24). Posteriormente, se conformaron grupos por especie (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*), ubicación de la trampa de larvas y sexo, aunque, debido al reducido número de ejemplares, en algunas ocasiones los grupos se conformaron con ejemplares de ambos sexos a fin de optimizar los recursos.

Una vez conformados los grupos con un máximo de 11 mosquitos para ampliar su sensibilidad, se llevaron al Laboratorio de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI) de la Universidad de Antioquia para el análisis molecular.

Análisis molecular

En la detección viral se empleó la técnica de RT-PCR. Cada grupo de mosquitos se maceró mecánicamente; el ARN se extrajo utilizando el estuche comercial de RNeasy Mini Kit® (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, se hizo la síntesis del ADN complementario (ADNc) utilizando 10 µl del ARN extraído, 1X de solución tampón específica de la transcriptasa inversa, 1 mM de dNTP, 10 µM de un cebador específico del virus del dengue (DV3-5´-AARTGIGCYTCRTC CAT-3´) y 1 µl de transcriptasa inversa (Fermentas); la mezcla se incubó a 42 °C durante una hora y la enzima se inactivó a 94 °C durante 10 minutos.

Para la amplificación del virus, se utilizaron 3 µl del ADNc; 1X de solución tampón; 2,0 mM de MgCl2; 0,2 mM de dNTP; 0,2 µM de cada cebador específico (DSP1-5´- AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG-3´ para DENV-1; DSP2 -5´- CCGGTGTGCTCRG CYCTGAT-3´ para DENV-2; DSP3 -5´-TTAGAGT YCTTAAGCGTCTCTTG -3´ para DENV-3, y DSP4 -5´-CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG-3´ para DENV-4), y 0,5 U de taq ADN polimerasa (25).

Las condiciones de amplificación consistieron en una temperatura inicial de 95 °C durante 2 minutos, 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 55 °C

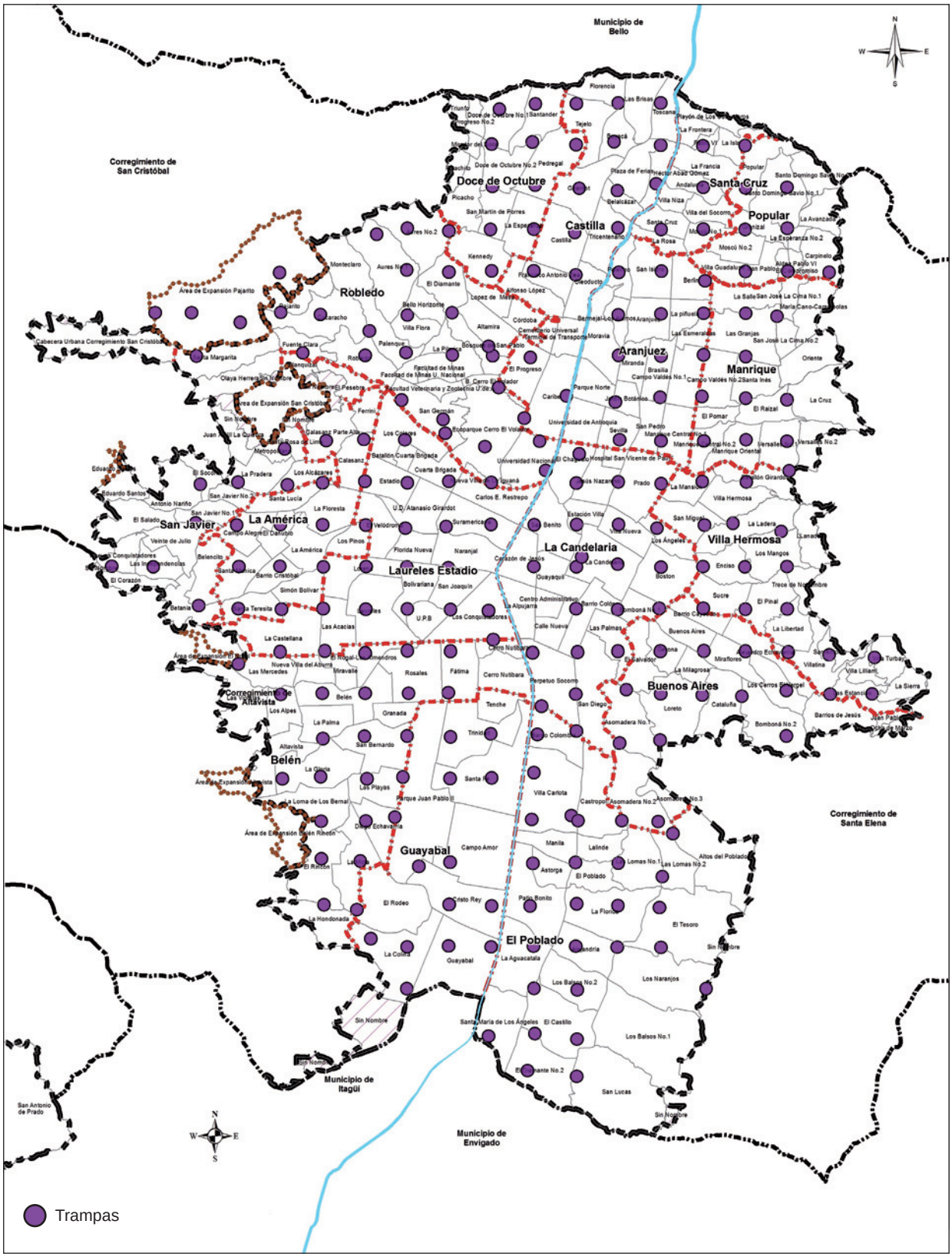


Figura 1. Ubicación geográfica de las trampas para larvas, que conforman el sistema de vigilancia entomológica de la Secretaría de Salud de Medellín.

durante 1 minuto y a 72 °C durante 40 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 3 minutos.

Los productos de amplificación se analizaron bajo luz UV en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio. El tamaño esperado para los serotipos DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 fue de 169, 362, 265 y 426 pares de bases (pb), respectivamente. En cada reacción se incluyeron controles negativos de extracción y amplificación; como control positivo, se utilizó el ARN de los cuatro serotipos del virus proveniente del sobrenadante de células infectadas, procesado simultáneamente y de la misma manera que los grupos de mosquitos.

Por último, para confirmar la presencia del virus en los grupos, se enviaron a Macrogen (Seúl, Corea) 22 muestras positivas seleccionadas aleatoriamente, 16 del primer muestreo y seis del segundo, para su secuenciación. Las secuencias hacia adelante y hacia atrás de cada una de las muestras y de los controles positivos se alinearon manualmente usando el programa BioEdit, versión 7.2.5, y se compararon con la base de datos del GenBank mediante el algoritmo BLASTN.

Análisis de la información

En el presente estudio se consideró como grupo positivo aquel con un único mosquito infectado, lo cual permitió estimar la tasa mínima de infección (26). Sin embargo, según Gu, *et al*. (27), tal presunción podría perder validez si las tasas de infección son altas o si los grupos están conformados por muchos ejemplares. Para obviar esta situación, el número máximo de mosquitos evaluados por grupo se estableció en 11 individuos, y algunos grupos estuvieron conformados por un solo ejemplar. La tasa mínima de infección se calculó dividiendo el número de grupos positivos por el número total de especímenes evaluados multiplicado por 1.000 (26). Para cada periodo de muestreo, se estimó la correspondiente tasa mínima de infección.

Asimismo, se estimó el índice de infestación de mosquitos adultos (IIA), un indicador aédico tradicional propuesto por la Organización Panamericana de la Salud para determinar el riesgo entomológico de transmisión (16). Este se calculó como el número de localidades (viviendas, instituciones educativas o centros de salud) con presencia de mosquitos adultos dividido por el número de localidades visitadas y multiplicado por 100. El IIA permitió comparar el riesgo entomológico por localidades y por periodo de muestreo.

Resultados

Se recolectaron 1.507 mosquitos durante ambos muestreos, de los cuales 1.497 correspondieron a *Ae. aegypti* (805 hembras y 692 machos) y 10 a *Ae. albopictus* (siete hembras y tres machos). La mayoría de los mosquitos (64,5 %) se recolectaron durante el segundo período de muestreo (cuadro 1).

Las viviendas fueron los sitios en donde mayor cantidad de mosquitos se recolectó durante los dos períodos (1.362), seguidas por las instituciones educativas (119) y los centros de salud (26) (cuadro 1). Sin embargo, cuando se calculó el IIA por tipo de localidad, se observó que, proporcionalmente, las instituciones educativas fueron los lugares con mayor presencia de mosquitos (23,57 %), seguidas de las unidades de salud (15 %) y, por último, las viviendas (9,30 %). Tal comportamiento en el porcentaje de infestación fue similar en los dos períodos de muestreo (figura 2).

Cuadro 1. Número de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* recolectados en diferentes localidades durante los dos periodos de muestreo

	Localidad	*Aedes aegypti*			*Aedes albopictus*			
		H (n)	M (n)	T (n)	H (n)	M (n)	T (n)	Total
Primer período	Viviendas	275	211	486	1	0	1	487
	Instituciones educativas	19	22	41	1	0	1	42
	Centros de salud	5	1	6	0	0	0	6
	Subtotal	299	234	533	2	0	2	535
Segundo período	Viviendas	465	406	871	3	1	4	875
	Instituciones educativas	30	43	73	2	2	4	77
	Centros de salud	11	9	20	0	0	0	20
	Subtotal	506	458	964	5	3	8	972
Total		805	692	1.497	7	3	10	1.507

H: mosquito hembra; M: mosquito macho; T: suma de la cantidad de mosquitos hembras y machos

Se conformaron 407 grupos con los mosquitos recolectados, 171 en el primer período y 236 en el segundo; 400 de estos grupos estaban conformados por mosquitos *Ae. aegypti*, la especie más abundante (169 en el primer periodo y 231 en el segundo), y siete, por *Ae. albopictus* (dos en el primer periodo y cinco en el segundo).

El análisis molecular mediante RT PCR evidenció que 132 grupos eran positivos para el virus del dengue, 65 en el primer período y 67 en el segundo. El porcentaje de grupos positivos por período de muestreo fue mayor en el primer período de recolección (38,01 %).

Vale la pena resaltar que la mayoría de los grupos positivos durante el primer período contenía un solo ejemplar, mientras que en el segundo periodo contenían tres (cuadro 2). Además, se observó que el mayor número de grupos positivos se encontró en las viviendas (119), seguidas de las instituciones educativas (10) y los centros de salud (3). Este comportamiento fue similar en los dos periodos de muestreo (cuadro 3).

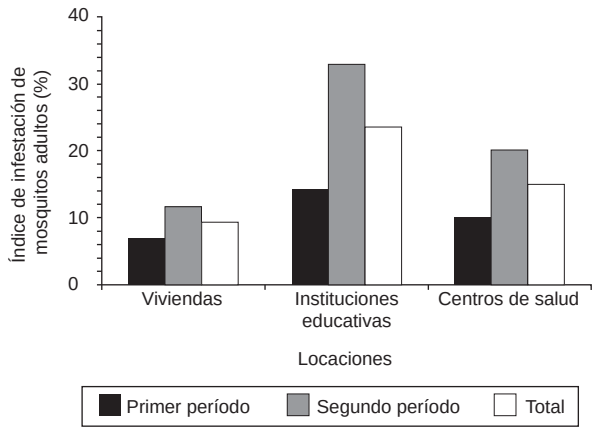


Figura 2. Índice de infestación de mosquitos adultos para las diferentes localidades en los períodos de muestreo

Cuadro 2. Cantidad de mosquitos por grupos positivos para el virus del dengue recolectados en los dos periodos de muestreo

N° mosquitos/ grupo	Total de grupos positivos Primer periodo	Total de grupos positivos Segundo periodo
1	25	9
2	12	10
3	7	11
4	8	4
5	3	10
6	1	2
7	3	8
8	3	5
9	2	3
10	1	4
11	0	1
Total	65	67

De los 65 grupos positivos en el primer período, 64 correspondieron a *Ae. aegypti* y uno a *Ae. albopictus*, mientras que en el segundo período todos los grupos positivos correspondieron a *Ae. aegypti*. Además, 35 de los grupos positivos estaban conformados por mosquitos hembra (34 de *Ae. aegypti* y uno de *Ae. albopictus*), 19 por machos (todos de *Ae. aegypti*) y 78 por hembras y machos (todos de *Ae. aegypti*) (cuadro 4).

En cuanto a la tasa mínima de infección en *Ae. aegypti*, esta fue de 120,07 en el primer periodo y de 69,50 en el segundo, en tanto que la de *Ae. albopictus* fue de 500 en el primer periodo.

Se obtuvieron resultados de la secuenciación para 21 de las 22 muestras enviadas, y en todas ellas se identificó el virus del dengue, lo cual confirmó el resultado obtenido mediante la amplificación por PCR. Cinco de las muestras secuenciadas pertenecían a grupos que solo tenían un individuo macho, cuatro de las cuales fueron corroboradas por secuenciación, confirmando así la transmisión vertical (cuadro 5).

El análisis espacial evidenció que los grupos positivos del primer periodo se ubicaron en 56 barrios de la ciudad, en tanto que en el segundo periodo se ubicaron en 52 barrios. Asimismo, se encontraron grupos positivos en 16 barrios durante los dos periodos: Bosques de San Pablo, San Germán y Universidad Nacional (comuna 7); Los Mangos y Las Estancias (comuna 8); Buenos Aires (comuna 9); Bomboná N° 1 (comuna 10); Las Acacias, Laureles y Lorena (comuna 11); Los Pinos (comuna 12); La Florida y Astorga (comuna 14); Diego Echavarría y Belén Rincón (comuna 16), y San Antonio de Prado (comuna 80) (figuras 3 y 4).

Discusión

En el presente estudio se pudo comprobar la utilidad de la vigilancia virológica en los mosquitos para la adopción de decisiones en torno al control del dengue. Se comprobó la infección con el virus del dengue tanto en ejemplares de *Ae. aegypti* (hembras y machos) como de *Ae. albopictus* (hembras) provenientes de diferentes barrios de Medellín, lo cual evidenció la amplia circulación geográfica del virus en la ciudad. Es importante mencionar las altas tasas de infección observadas,

Cuadro 3. Número de grupos conformados y de grupos positivos para el virus del dengue por localidad durante los dos periodos de muestreo

Localidad	Grupos conformados			Grupos positivos			Positividad del grupo
	Primer período	Segundo período	Total	Primer período	Segundo período	Total	
Viviendas	158	209	367	59	58	119	32,43
Instituciones educativas	10	21	31	5	7	10	32,26
Centros de salud	3	6	9	1	2	3	33,33
Total	171	236	407	65	67	132	32,43

Cuadro 4. Grupos de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* recolectados en los dos periodos de muestreo

	Especie	Grupo	Número de grupos conformados	Número de grupos positivos
Primer periodo	*Aedes aegypti*	Hembras	54	26
		Machos	28	10
		Hembras y machos	87	28
	Aedes albopictus	Hembras	2	1
		Machos	0	0
		Hembras y machos	0	0
Segundo periodo	*Aedes aegypti*	Hembras	42	8
		Machos	44	9
		Hembras y machos	145	50
	Aedes albopictus	Hembras	3	0
		Machos	1	0
		Hembras y machos	1	0

Cuadro 5. Resultados de la secuenciación de los grupos analizados y sus respectivos controles

Muestreo	Nombre del grupo	Número de mosquitos/grupo	Diagnóstico por PCR	Resultado del BLASTN Identidad (%)/valor esperado	Verificación por secuenciación
Primer periodo	20160041	1	D1-D4	$97/4x10^{-155}$	D4
	20160048	1	D4	$98/4x10^{-178}$	D4
	20160055	1	D1	No hit	-
	20160062	1	D4	$98/6x10^{-177}$	D4
	20160066	1	D4	97/0	D4
	20160098	7	D1-D4	$99/1x10^{-134}$	D4
	20160102	2	D1-D4	$99/3x10^{-130}$	D4
	20160107	1	D1-D4	$99/5x10^{-138}$	D4
	20160113	10	D4	$99/2x10^{-135}$	D4
	20160116	2	D4	99/0	D4
	20160128	2	D1-D4	$96/6x10^{-144}$	D4
	20160141	1	D1-D4	$96/4x10^{-136}$	D4
	20160148	6	D1-D4	98/0	D4
	20160164	9	D4	$94/2x10^{-45}$	D4
	20160109	7	D2	$98/1x10^{-63}$	D2
	20160111	1	D2	$79/1x10^{-48}$	D2
Segundo periodo	20160315	2	D3	$99/2x10^{-90}$	D3
	20160324	3	D3	$99/6x10^{-79}$	D3
	20160350	1	D4	$98/8x10^{-78}$	D4
	20160380	1	D3	$99/2x10^{-100}$	D3
	20160333	3	D3	$99/5x10^{-59}$	D3
	20160348	2	Negativo	No hit	-
Controles	Control DENV1	ARN de cultivo	D1	$96/7x10^{-53}$	D1
	Control DENV2	ARN de cultivo	D2	$99/1x10^{-160}$	D2
	Control DENV3	ARN de cultivo	D3	$98/2x10^{-108}$	D3
	Control DENV4	ARN de cultivo	D4	100/0	D4

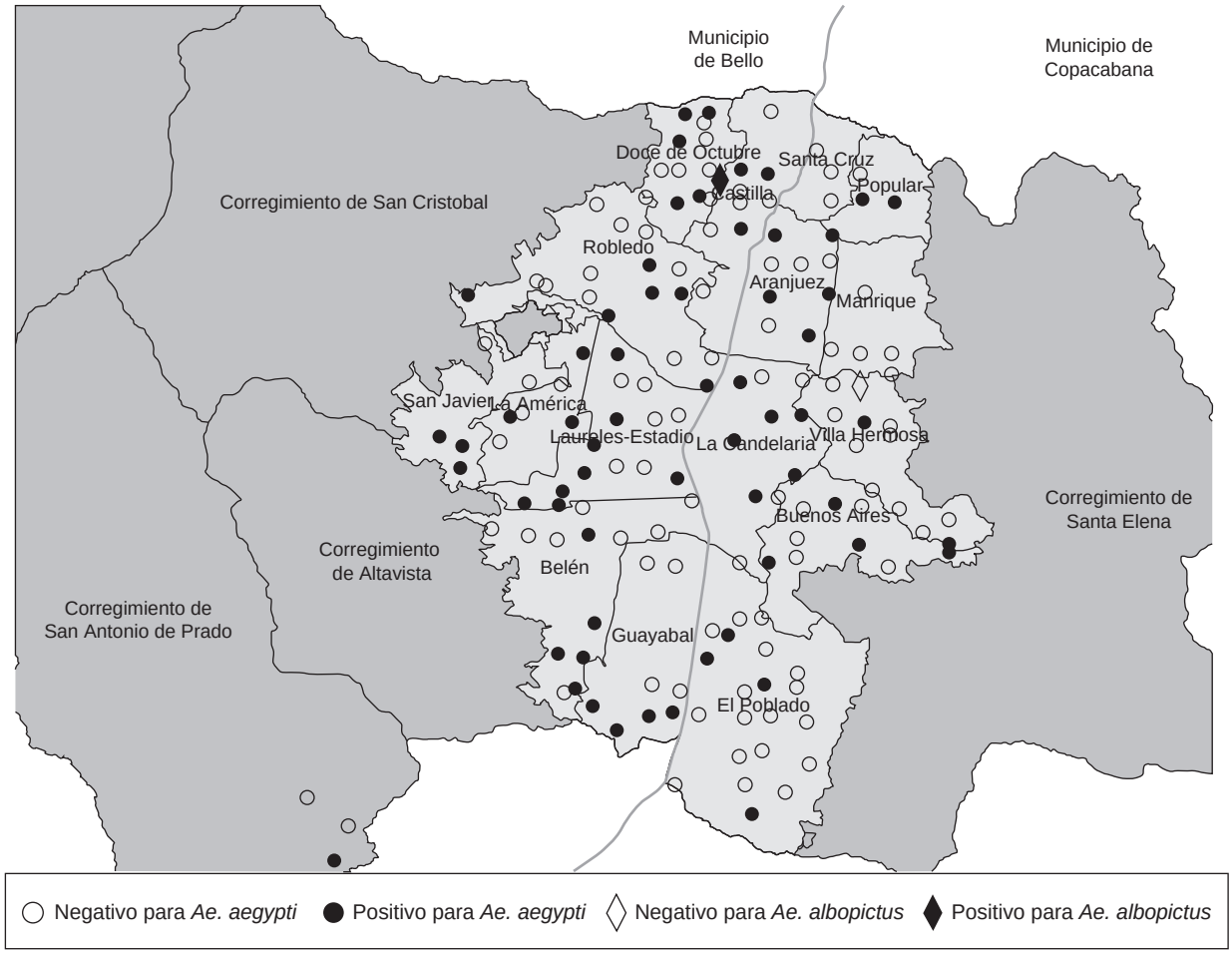


Figura 3. Ubicación geográfica de grupos de mosquitos positivos y negativos para el virus del dengue recolectados durante el primer período de muestreo (febrero a marzo de 2016)

lo cual concuerda con lo hallado por Pérez-Castro, *et al*. (28), en los municipios de Anapoima y La Mesa en Cundinamarca.

Las altas tasas de infección natural con el virus del dengue en *Ae. aegypti* no son sorprendentes si se considera la grave epidemia que registró la ciudad durante los periodos de recolección. En el Valle del Cauca, también se han reportado tasas de infección de *Ae. aegypti* significativamente mayores durante las epidemias que durante los periodos posteriores a estas (6). Igualmente, al analizar los resultados de la infección natural de *Ae. aegypti* en Armero-Guayabal (Tolima) y en Villeta (Cundinamarca), se comprobó que una gran proporción de mosquitos se infectaba durante las epidemias de dengue (29).

En Colombia, la infección natural de *Ae. aegypti* con el virus del dengue se ha reportado en otros estudios (6,8,30). Sin embargo, en el presente estudio se destacaron las altas tasas de infección observadas, lo cual concuerda con lo hallado por Pérez-Castro, *et al*. (28), en los municipios de Anapoima y La Mesa en Cundinamarca.

Es posible que en Medellín las altas tasas de infección natural con el virus del dengue en *Ae. aegypti* estén asociadas con la grave epidemia que se registró en la ciudad durante los periodos de recolección. Similares hallazgos fueron reportados por Méndez, *et al.* (6), en el Valle del Cauca, con tasas de infección de *Ae. aegypti* significativamente mayores durante las epidemias que en los periodos posteriores a estas. Asimismo, en su estudio sobre la infección natural de *Ae. aegypti* en Armero, Guayabal (Tolima) y Villeta (Cundinamarca), Groot (31) observó que una gran proporción de los mosquitos se infectaban durante las epidemias de dengue.

Un resultado relevante en este estudio fue la infección natural con el virus del dengue en mosquitos machos de *Ae. aegypti*, ya que 15,38 y 13,43 %

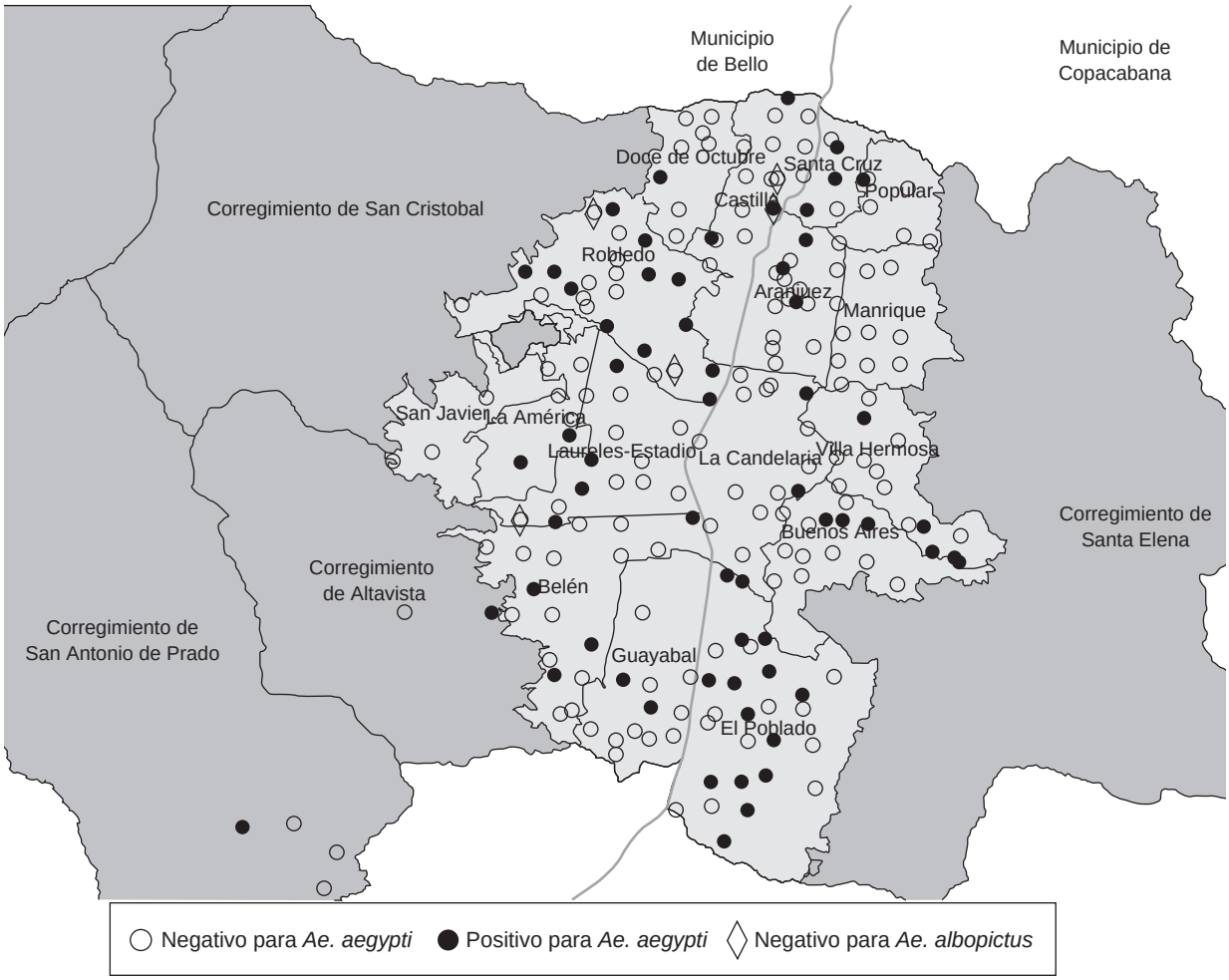


Figura 4. Ubicación geográfica de los grupos de mosquitos positivos y negativos para el virus del dengue recolectados durante el segundo período de muestreo (mayo a junio de 2016)

de los grupos positivos estaban conformados por machos en el primer periodo y en el segundo, respectivamente. La infección natural con el virus del dengue en mosquitos machos se debe a la transmisión vertical, tal como lo han señalado Joshi, *et al*. (32), Thenmozhi, *et al*. (33), y Pessoa, *et al.* (34). Especialmente en este último estudio se encontraron machos tanto de *Ae. aegypti* como de *Ae. albopictus* naturalmente infectados con el virus del dengue, aunque el porcentaje de infección (1,33 %) de *Ae. aegypti* en el estudio de Pessoa, *et al*., fue muy inferior en comparación con lo registrado en el presente estudio, posiblemente por la gran especificidad de los marcadores empleados en este.

La presencia de mosquitos machos infectados podría implicar el mantenimiento de la transmisión viral, tal como lo señalaron Espinosa, *et al.* (35) en su estudio sobre la epidemia de dengue en Puerto Iguazú (Argentina), así como Le Goff, *et al.* (36) al observar la alta prevalencia de infección natural en mosquitos machos, incluso mayor que en las hembras, durante la epidemia de dengue del 2007 en Santa Cruz de La Sierra (Bolivia). Debe considerarse que la transmisión vertical, además de la aparición de machos infectados, también puede dar origen a mosquitos hembras infectadas, lo cual entrañaría un mayor riesgo de transmisión, ya que tales ejemplares no requerirían pasar por el período de incubación extrínseca del virus en el estadio adulto, como sí ocurre en la transmisión horizontal. Además, los mosquitos hembra infectados verticalmente pueden ser poco longevos y ser transmisores competentes del arbovirus (37).

En el caso de Medellín, es posible que los mosquitos machos con infección transmitida verticalmente actúen como reservorios del virus, en tanto que las

hembras tendrían la capacidad de transmitir el virus desde el momento en que llegan a su fase adulta, lo cual podría ayudar a explicar la grave epidemia que se registró en la ciudad durante el 2016. Además, los resultados de este estudio sugieren que los programas de vigilancia y control de las ETV no solo deben focalizar sus esfuerzos en la vigilancia entomológica de las hembras, sino también de los machos, pues estos podrían servir como indicadores de la presencia del virus en la naturaleza.

Con relación a la tasa mínima de infección, los valores observados en los dos períodos de muestreo (121,95 y 68,93, respectivamente) fueron considerablemente mayores que los reportados en otros estudios. Por ejemplo, Pérez-Castro, *et al.,* registraron una tasa de 33,3 en Anapoima y La Mesa (Cundinamarca) (28), en tanto que en Santa Cruz de la Sierra (Bolivia), Le Goff, *et al*., registraron una de 1,01 (36). Un valor más próximo al registrado en este estudio en el segundo período de muestreo se reportó en Singapur (57,6) (38).

Es probable que la diferencia en los valores de la tasa mínima de infección en estos estudios se deba a las condiciones epidemiológicas propias de cada localidad, a las densidades poblacionales de las especies evaluadas y a la reacción de los ejemplares a variables ambientales y sociales propias de diferentes condiciones ecoepidemiológicas. Durante la recolección de los ejemplares en Medellín, la ciudad atravesaba por una grave epidemia de dengue, similar a la registrada en el 2010, año de una de las epidemias de dengue más graves registrada en las Américas (39). En este sentido vale recordar que, según Le Goff, *et al*. (36), la transmisión vertical del virus del dengue puede detectarse tanto en la etapa de máxima transmisión en una epidemia, como meses antes de ella.

En el presente estudio también se observó la infección natural de *Ae. albopictus* con el virus del dengue. Esta especie se reportó por primera vez en la ciudad en el 2011 (40), y según los informes de la Secretaría de Salud de Medellín, su distribución se ha venido ampliando paulatinamente. En Colombia, la infección natural de *Ae. albopictus* con el virus del dengue no se ha registrado con frecuencia. El primer registro fue en Buenaventura (Valle del Cauca) en el 2006 (6), en tanto que en Medellín este es el primer registro de infección natural de la especie. Sin embargo, en Singapur, México, Tailandia, Malasia e India, entre otros lugares, es común encontrar *Ae. albopictus* infectado naturalmente con el virus del dengue (38,41-44).

Aunque el papel vectorial de *Ae. albopictus* en el país todavía se desconoce, esta especie requiere vigilancia especial debido a su rápida y agresiva dispersión, con la cual ha colonizado todos los continentes, excepto la Antártica (45). Además, debe anotarse que esta especie ha sido el único vector responsable de diferentes brotes de dengue en lugares como Hawaii, algunas islas del océano Índico y China (45), y que, según los resultados de diversos estudios de competencia vectorial, podría transmitir más de 20 tipos de arbovirus, entre ellos el del chikungunya y el del oeste del Nilo (46). Por ello, las implicaciones epidemiológicas de *Ae. albopictus* en la transmisión de diferentes arbovirus en el país deben considerarse seriamente, con el fin de actualizar las estrategias de vigilancia, prevención y control (47).

En cuanto al IIA, en el presente estudio se observó que las instituciones educativas presentaban el mayor riesgo entomológico de transmisión, comparadas con las viviendas y los centros de salud. A pesar de que se ha considerado que los índices aédicos no son muy precisos (20), las instituciones educativas deben tenerse en cuenta como sitios prioritarios de intervención, e implementar en ellas programas formales de salud pública, tal como lo proponen Olano, *et al.* (48).

En conclusión, los resultados aquí reportados evidencian que la vigilancia virológica mediante técnicas moleculares constituye una poderosa herramienta para la vigilancia, la prevención y el control de las ETV, por lo cual debería incorporarse a los programas de dichas enfermedades en el país. Asimismo, sería recomendable hacerla extensiva a virus como el del Zika y el del chikungunya, que circulan en el país y cuyo principal vector también es *Ae. aegypti*.

Agradecimientos

Los autores expresan sus sinceros agradecimientos a las personas que permitieron el ingreso a sus viviendas para los muestreos entomológicos, así como a la Secretaría de Salud de Medellín, por el apoyo logístico y por facilitar la información entomológica y virológica, y a la Universidad de Antioquia, al Sistema de Información para la Investigación Universitaria y a la Corporación Académica para el Estudio de Patologías Tropicales, proyecto con código CPT1403, del cual este estudio hizo parte.

Conflicto de intereses

Los autores manifestamos que no existe ningún conflicto de intereses relacionado con los resultados presentados en este documento.

Financiación

Este estudio se realizó gracias a los convenios interadministrativos firmados entre la Secretaría de Salud de Medellín y la Universidad de Antioquia (Grupo de Entomología Médica, Facultad de Medicina). El grupo BCEI recibió apoyo de la Universidad de Antioquia.

Referencias

1. **Hales S, de Wet N, Maindonald J, Woodward A.** Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: An empirical model. Lancet. 2002;360: 830-4. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09964-6
2. **Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, *et al*.** Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1760. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760
3. **Velandia ML, Castellanos JE.** Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infectio. 2011;15:33-43. https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1
4. **Delatte H, Paupy C, Dehecq J-S, Thiria J, Failloux A, Fontenille D.** *Aedes albopictus*, vecteur des virus du chikungunya et de la dengue a la Réunion: biologie et contrôle. Parasite. 2008;15:3-13. https://doi.org/10.1051/parasite/2008151003
5. **Kyle JL, Harris E.** Global spread and persistence of dengue. Annu Rev Microbiol. 2008;62:71-92. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005
6. **Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, *et al*.** Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2006;74: 678-83. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.678
7. **Padilla J, Rojas D, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera edición. Bogotá: Guías de Impresión Ltda.; 2012. p. 248.
8. **Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, *et al*.** Presencia de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. Biomédica. 2016;36:303-8. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301
9. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semana 52. Fecha de consulta: 1° de agosto de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/BoletnEpidemiolgico/2015Boletinepidemiologico Semana 52.pdf
10. **Gubler DJ.** Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. Bull Pan Am Health Organ. 1998;23:397-404.
11. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semana 23. Fecha de consulta: 1 de marzo de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2023.pdf
12. **Ortiz RC, Rúa-Uribe G, Suárez AC, Mafla MA, Almanza R, Laurentino dos Santos S.** Distribución espacial de casos e incidencia de dengue: análisis de la situación para Medellín. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 2013;31:330-37.
13. **Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia.** Situación actual de dengue a semana 12 de 2013. Periodo de análisis: 2008-2013. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2016. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/INFORME%20SITUACION%20DE%20DENGUE.pdf.
14. **World Health Organization.** Dengue: Prevention and control. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2016. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB136/B136_24-en.pdf
15. **Gómez-Dantés H, San Martín JL, Danis-Lozano R, Manrique-Saide P.** La estrategia para la prevención y el control integrado del dengue en Mesoamérica. Salud Pública Méx. 2011;53:S349-57.
16. **Pan American Health Organization.** Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Fecha de consulta: 4 de marzo de 2016. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6134&Itemid=40734&lang=en
17. **Focks D.** A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. WHO/TDR/IDE/Den/2003.1. Geneva: WHO; 2003. p. 38
18. **Focks D, Villegas E, Romero-Vivas CM, Midega J, Bisset J, Morrison A, *et al*.** Multicountry study of *Aedes aegypti* pupal productivity survey methodology- Findings and recommenda-tions. WHO/TDR/IDE/Den/2006.1. Geneva: WHO; 2006. p. 48.
19. **Bowman LR, Runge-Ranzinger S, McCall PJ.** Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: A systematic review of the evidence. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2848. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002848
20. **Boyer S, Foray C, Dehecq JS.** Spatial and temporal heterogeneities of *Aedes albopictus* density in La Reunion Island: Rise and weakness of entomological indices. PLoS One. 2014;9:e91170. https://doi.org/110.1371/journal.pone.0091170
21. **Calle D, Henao E, Rojo R, Almanza R, Rúa-Uribe G.** Experiencias en el control integrado de la epidemia de dengue del año 2010 en Medellín. Revista Facultad Nacional de Salud Pública Medellín. 2011;5:77-88.
22. **Lee KS, Lai YL, Lo S, Barkham T, Aw P, Ooi PL, *et al*.** Dengue virus surveillance for early warning, Singapore. Emerg Infect Dis. 2010;16:847-49. https://doi.org/10.3201/eid1605.091006.
23. **Urdaneta L, Herrera F, Pernalete M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R, *et al*.** Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela, by type-specific polymerase chain reaction. Infect Genet Evol. 2005;5:177-84. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.09.004
24. **Rueda LM.** Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. Zootaxa. 2004;589:1-60. https://doi.org//10.11646/zootaxa.589.1.1
25. **Seah CL, Chow VT, Tan HC, Chan YC.** Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. J Virol Methods. 1995;51:193-200. https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00104-O

26. **Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ.** Estimation of infection rates in population of organisms using pools of variable size. Am J Epidemiol. 1980;112:124-8. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112961

27. **Gu W, Lampman R, Novak R.** Problems in estimating mosquito infection rates using minimum infection rate. J Med Entomol. 2003;40:595-6. https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.5.595

28. **Pérez-Castro R, Castellanos JE, Olano VA, Matiz MI, Jaramillo JF, Vargas SL, *et al*.** Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111: 233-40. https://doi.org/10.1590/0074-02760150363

29. **Groot H, Morales A, Romero M, Ferro C, Prías E, Vidales H, *et al.*** Estudios de arbovirosis en Colombia en la década de 1970. Biomédica. 1996;16:331-44.

30. **Romero-Vivas CM, Leake CJ, Falconar AK.** Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. Med Vet Entomol. 1998;12:284-8. https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00117.x

31. **Groot H.** The reinvasion of Colombia by *Aedes aegypti*: Aspects to remember. Am J Trop Med Hyg. 1980;29:330-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.330

32. **Joshi V, Mourya DT, Sharma RC.** Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:158-61. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.158

33. **Thenmozhi V, Hiriyan JG, Tewari SC, Samuel PP, Paramasivan R, Rajendran R, *et al*.** Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a Southern Indian State. Jpn J Infect Dis. 2007;60:245-9.

34. **Pessoa VE, Alencar CH, Kamimura MT, Kamimura MT, de Carvalho Araujo FM, De Simone SG, *et al*.** Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. PLoS One. 2012;7:e41386. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041386

35. **Espinosa M, Giamperetti S, Abril M, Seijo A.** Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56:165-7. https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200013

36. **Arunachalam N, Tewari SC, Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, *et al.*** Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. Indian J Med Res. 2008;127:395-7.

37. **Rosen L.** Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. CR Acad Sci III. 1987;304:347-50.

38. **Chow V, Chan Y, Yong R, Lee K.** Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. Am Soc Trop Med Hyg. 1998;58:578-86. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.578

39. **Pan American Health Organization/World Health Organization.** State of the art in the prevention and control of dengue in the Americas. Meeting Report. Washington, D.C.: PAHO; 2014. p. 1-78.

40. **Rúa-Uribe G, Acosta CS, Londoño V, Sánchez J, Rojo R, Novoa BB.** Primera evidencia de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Medellín, Antioquia - Colombia. Revista Facultad Nacional de Salud Pública Medellín. 2011;5:89-98.

41. **Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, *et al.*** First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, México. Med Vet Entomol. 1997;11:305-9. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00413.x

42. **Thavara U, Siriyasatien P, Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Anantapreecha S, Wongwanich R, *et al.*** Double infections of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006;37:468-76.

43. **Rohani A, Asmaliza I, Zainah S, Lee H.** Detection of dengue virus from field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adults and larvae. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997;28:138-42.

44. **Thenmozhi V, Hiriyan J.** Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a southern Indian state. Jpn J Infect Dis. 2007; 60:245-9.

45. **Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA.** The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. Trends Parasitol. 2013;29:460-8. https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003

46. **Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D.** *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. Microbes Infect. 2009;11:1177-85. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005

47. **Rúa-Uribe GL, Suárez C, Rojo R.** Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 2012;30:328-37.

48. **Olano VA, Matiz MI, Lenhart A, Cabezas L, Vargas SL, Jaramillo JF, *et al.*** Schools as potential risk sites for vector-borne disease transmission: Mosquito vectors in rural schools in two municipalities in Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 2015;31:212-22. https://doi.org/10.2987/moco-31-03-212-222.1

Biomédica 2017;37(Supl.2):167-79
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3559

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección de unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* en triatominos recolectados en diferentes regiones naturales de Perú

Carlos P. Padilla[1], Uriel Alvarado[2], Gladis Ventura[1], Deysi Luna-Caipo[3], Marcial Suárez[4], José R. Tuñoque[5], Nancy Ruelas-Llerena[6], Luis A. Fachin[7], Alina Huiza[8], Lizandro Gonzales[9], Julio César Carranza[2], Gustavo Adolfo Vallejo[2], Abraham G. Cáceres[10,11,12]

[1] Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú
[2] Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia
[3] Dirección Subregional de Salud de Cutervo, DIRESA Cajamarca, Cajamarca, Perú
[4] Laboratorio de Entomología, Laboratorio de Referencia Regional de la Dirección de la Red de Salud Bagua, DIRESA Amazonas, Amazonas, Perú
[5] Área de Vigilancia y Control Vectorial, Unidad de Salud Ambiental, Dirección de la Red de Salud de Utcubamba, DIRESA Amazonas, Amazonas, Perú
[6] Departamento de Microbiología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional San Agustín, Arequipa, Perú
[7] Laboratorio de Entomología, Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública, DIRESA Ucayali, Ucayali, Perú
[8] Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión", Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
[9] Área de Entomología, Laboratorio de Referencia Regional de Amazonas, DIRESA Amazonas, Amazonas, Perú
[10] Laboratorio de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú
[11] Sección de Entomología, Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
[12] Departamento Académico de Microbiología Médica, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

Introducción. *Trypanosoma cruzi* se ha dividido en seis unidades taxonómicas discretas (*Discreet Typing Units*, DTU) denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI. Aún se desconocen los factores determinantes de la dinámica de la transmisión vectorial de los genotipos de *T. cruzi* en las diferentes regiones geográficas de distribución de la enfermedad de Chagas en Perú.
Objetivo. Detectar y tipificar las unidades taxonómicas discretas de *T. cruzi* en las heces de siete especies de triatominos (*Panstrongylus chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *Rhodnius robustus*, *R. pictipes*, *Triatoma carrioni* y *T. infestans*), capturados en ocho departamentos de diferentes regiones naturales de Perú.
Materiales y métodos. Se examinaron 197 insectos para la detección de tripanosomas. Se extrajo el ADN del contenido intestinal de cada insecto y se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes *kDNA*, *SL-IR*, *24Sα rRNA* y *18Sα RNA* para detectar las DTU de *T. cruzi.*
Resultados. Se detectaron cinco infecciones con *T. rangeli* y 113 con *T. cruzi*. De estas últimas, fue posible identificar 95 de TcI (dos en *P. chinai*, una en *P. geniculatus*, 68 en *P. herreri*, cuatro en *R. pictipes*, siete en *R. robustus*, una en *T. carrioni*, y 12 en *T. infestans*); cinco de TcII (cuatro en *P. herreri*, una en *T. infestans*); cuatro de TcIII (tres en *P. herreri*, una en *R. robustus*) y cuatro infecciones de TcIV en *P. herreri*.
Conclusión. Este es el primer trabajo de caracterización a gran escala de *T. cruzi* en el intestino de vectores de importancia epidemiológica en Perú, orientado a generar información básica que permita entender la dinámica de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en esta región del continente.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma rangeli*; Triatominae; genotipo; Perú.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3559

Contribución de los autores:
Carlos P. Padilla y Uriel Alvarado: procesamiento de muestras, detección molecular de las unidades discretas de tipificación y análisis de datos
Julio César Carranza: mantenimiento de las unidades discretas de tipificación de referencia
Gladis Ventura: procesamiento de muestras
Deysi Luna-Caipo, Marcial Suárez, José R. Tuñoque-Valdera, Luis A. Fachin y Lizandro Gonzáles: captura de triatominos e interacción con las personas de las diversas localidades de estudio
Nancy Ruelas-Llerena: trabajo de laboratorio, captura e identificación de triatominos, interacción con las personas de las diversas localidades de estudio de las provincias de Arequipa
Alina Huiza: trabajo de laboratorio e identificación de triatominos
Gustavo Adolfo Vallejo y Abraham G. Cáceres: diseño del proyecto y análisis de datos
Abraham G. Cáceres: captura e identificación de triatominos
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Identifying *Trypanosoma cruzi* discreet typing units in triatomines collected in different natural regions of Perú

Introduction: *Trypanosoma cruzi* has been divided by international consensus into six discrete typing units (DTU): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI. The factors determining the dynamics of *T. cruzi* genotypes vector transmission of Chagas' disease in the different geographical regions of Perú are still unknown.
Objective: To detect and type *T. cruzi* DTUs from the faeces of seven species of triatomines (*Panstrongylus chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *Rhodnius robustus*, *R. pictipes*, *Triatoma carrioni* and *T. infestans*) captured in eight departments from different natural regions of Perú.
Materials and methods: We examined 197 insects for detecting trypanosomes. DNA was extracted from each insect intestinal contents and PCR amplification of kDNA, SL-IR, 24Sα rRNA and 18Sα RNA was performed for detecting *T. cruzi* DTUs.
Results: Five *T. rangeli* and 113 *T. cruzi* infections were detected; 95 of the latter were identified as TcI (two in *P. chinai*, one in *P. geniculatus*, 68 in *P. herreri*, four in *R. pictipes*, seven in *R. robustus*, one in *T. carrioni*, 12 in *T. infestans*), five as TcII (four in *P. herreri*, one in *T. infestans*), four as TcIII (three in *P. herreri*, one in *R. robustus*) and four TcIV infections in *P. herreri*.
Conclusions: This is the first study which has attempted a large-scale characterization of *T. cruzi* found in the intestine of epidemiologically important vectors in Perú, thus providing basic information that will facilitate a better understanding of the dynamics of *T. cruzi* vector transmission in Perú.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma rangeli*; Triatominae; genotype; triatomines; Perú.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3559

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por *Trypanosoma cruzi* presente en 22 países de Latinoamérica, donde se estima que alrededor de ocho millones de personas están infectadas y 25 millones viven en áreas de riesgo (1). La transmisión de *T. cruzi* ocurre principalmente mediante la transmisión vectorial por contacto de las heces contaminadas de los triatominos con el huésped. Otras formas de transmisión se presentan por transfusión de sangre contaminada, trasplante de órganos infectados, transmisión congénita, accidentes de laboratorio y por vía oral debida a la ingestión de alimentos contaminados con heces del vector (1,2). *Trypanosoma cruzi* ha sido dividido en seis unidades discretas de tipificación (*Discreet Typing Units*, DTU): TcI, TcII, TcIII,TcIV, TcV y TcVI (3,4). Además, se han descrito nuevos genotipos como el Tc Bat, asociado con murciélagos en Brasil, Panamá y Colombia (5-8).

Se ha observado una distribución geográfica heterogénea de estos genotipos, así, por ejemplo, la TcI se ha detectado predominantemente en humanos, reservorios y vectores en Centroamérica, Colombia y Venezuela, en tanto que la TcII, la TcV y la TcVI son más comunes en los países del Cono Sur del continente americano (9-11). Al parecer, es posible encontrar todos los genotipos a lo largo del continente americano, pero con predominio de algunos de ellos en diferentes regiones geográficas. Pocas correlaciones se han observado entre la distribución de las DTU de *T. cruzi* y las características clínicas de la enfermedad (12,13). Asimismo, se han observado diferencias en la distribución de los genotipos de *T. cruzi* en los reservorios domésticos, por ejemplo, los perros en la región norte de América se han encontrado infectados predominantemente con TcI y, en el sur del continente, con TcIV, TcV y TcVI (14). Con relación a los reservorios silvestres, se ha observado que la mayoría de los *Didelphis marsupialis* y los reservorios arbóreos se encuentran infectados con TcI (15). Por ello, se ha planteado la hipótesis de que los reservorios arbóreos estarían infectados con TcI y los reservorios terrestres con las unidades TcII a TcVI (16). Sin embargo, se han encontrado varios reservorios arbóreos, como *Monodelphis brevicaudata*, *Philander frenatus* y *Didelphis aurita*, infectados con TcII, TcIV y TcII, respectivamente (5,10).

En cuanto a los genotipos de *T. cruzi* aislados de triatominos, en varios estudios se ha demostrado la asociación de genotipos de *T. cruzi* en algunas especies de vectores, por ejemplo, se ha encontrado predominancia de TcI en el intestino de *Rhodnius prolixus*, *R. colombiensis* y *R. pallescens* en vectores domésticos y silvestres en Colombia, con prevalencias de 2,1 a 78,6 % (17). Además, se ha observado que la TcI se encuentra asociada a los ciclos domésticos y silvestres en Colombia,

Correspondencia:
Abraham G. Cáceres, Laboratorio de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Calle Capac Yupanqui N° 1400, Jesús María, Lima, Perú
Teléfono: (051) 748 1111, anexo 1548
acaceres31@hotmail.com; agcl2011@gmail.com

Recibido: 18/08/16; aceptado: 18/08/17

Venezuela y en algunos países de Centroamérica, y a los ciclos selváticos en la Amazonia, en tanto que TcII, TcV y TcVI se han relacionado con ciclos domiciliarios en los países del Cono Sur de Suramérica. Los linajes TcIII y TcIV son los más raros, y se han relacionado con la transmisión selvática, con pocos reportes de infección en humanos (18).

A pesar de los estudios sobre la epidemiología molecular de *T. cruzi*, aún existen varios interrogantes sobre los factores que determinan la dinámica de transmisión de los genotipos de *T. cruzi* en las diferentes regiones endémicas de la enfermedad de Chagas. Asimismo, en los estudios sobre la interacción entre parásito y vector se ha señalado la presencia de factores de la respuesta inmunitaria del insecto (19) o de la microbiota intestinal, que estarían facilitando o impidiendo la transmisión de los genotipos de *T. cruzi* (20,21).

En Perú, se han documentado casos de enfermedad de Chagas en varias localidades de los departamentos de Arequipa, Moquegua, Madre de Dios, Lambayeque, Ica, Tacna, Ucayali, Loreto, San Martín, Cajamarca, Pasco y Amazonas (22). En un estudio sobre seroprevalencia de *T. cruzi* en humanos, perros y cobayos, se encontraron porcentajes de 14,9 % ($IC_{95\%}$ 12,2-18,0), 19,8 % ($IC_{95\%}$ 12,7-28,7) y 3,3 % ($IC_{95\%}$ 1,4-6,9), respectivamente (23).

Se han descrito 18 especies de triatominos en Perú, de las cuales *Triatoma infestans*, *T. carrioni*, *Panstrongylus herreri*, *P. chinai*, *P. geniculatus* y *R. ecuadoriensis* están involucradas en la transmisión de *T. cruzi* (24-29). En este país, son escasos los estudios sobre caracterización molecular de los tripanosomas detectados en triatominos; por esta razón, el propósito del presente estudio fue detectar y tipificar las DTU de *T. cruzi* en las heces de siete especies de triatominos capturados en ocho departamentos localizados en diferentes regiones naturales de Perú. Se decidió por la detección y caracterización directa de los tripanosomas presentes en las heces para evitar la selección de cepas o DTU cuando los parásitos se llevan a medios de cultivo o se aíslan en animales de laboratorio (30).

Este es el primer estudio de caracterización a gran escala de *T. cruzi* en el intestino de vectores de importancia epidemiológica en Perú con el propósito de generar información básica que permita entender la dinámica de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en esta región del continente.

Materiales y métodos

Material entomológico

Las capturas de los triatominos se hicieron entre 1995 y 2014 en el interior de las viviendas de áreas urbanas y rurales de ocho departamentos de Perú (Amazonas, Arequipa, Cajamarca, Lambayeque, San Martín, Pasco, Piura y Ucayali), ubicadas en las regiones naturales de Costa, Sierra y Selva (figura 1).

La búsqueda de los triatominos se hizo entre las 08:30 y las 19:00 horas; el tiempo de recolección en cada vivienda fue de 15 a 20 minutos y, para ello, se emplearon linterna de mano, vaso recolector y pinzas de 20 cm de largo.

En grietas, agujeros y hendiduras de las paredes internas de los dormitorios y de la cocina, el comedor y el cuyero, se recolectaron ejemplares adultos vivos y muertos, así como huevos, ninfas y exuvias en el caso de *P. herreri*.

Los ejemplares vivos (adultos y ninfas) se colocaron en vasos recolectores rotulados, recubiertos con papel filtro plegable en su interior; los huevos se pusieron en otros vasos rotulados con una porción de algodón en su interior y, los ejemplares muertos, en frascos pequeños con etanol al 90 %. El material se llevó al Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud y a la Sección de Entomología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La identificación de las especies se confirmó mediante claves taxonómicas (25,31).

Detección molecular de las DTU de T. cruzi

A partir del contenido intestinal de cada triatomino, se extrajo el ADN utilizando el estuche comercial PureLink Genomic DNA minikit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para confirmar la presencia de ADN de *T. cruzi*, se utilizó una PCR convencional con los iniciadores S35/S36, previamente documentados (32).

Las muestras positivas se procesaron para determinar el genotipo de *T. cruzi* mediante el protocolo reportado por Brisse, *et al*. (33): se hizo primero una PCR dirigida a la región del gen miniexón (34) para diferenciar la TcI (350 bp) del subgrupo de las TcII, TcV y TcVI (300 pb); la TcIII y la TcIV no generan ningún producto. Luego se hizo otra PCR para la región 24Sα rRNA, cuyos productos son la TcV (110 pb), la TcII y la TcVI (125 pb), la TcIII (110 pb) y la TcIV (120, 125 130 pb). Por último,

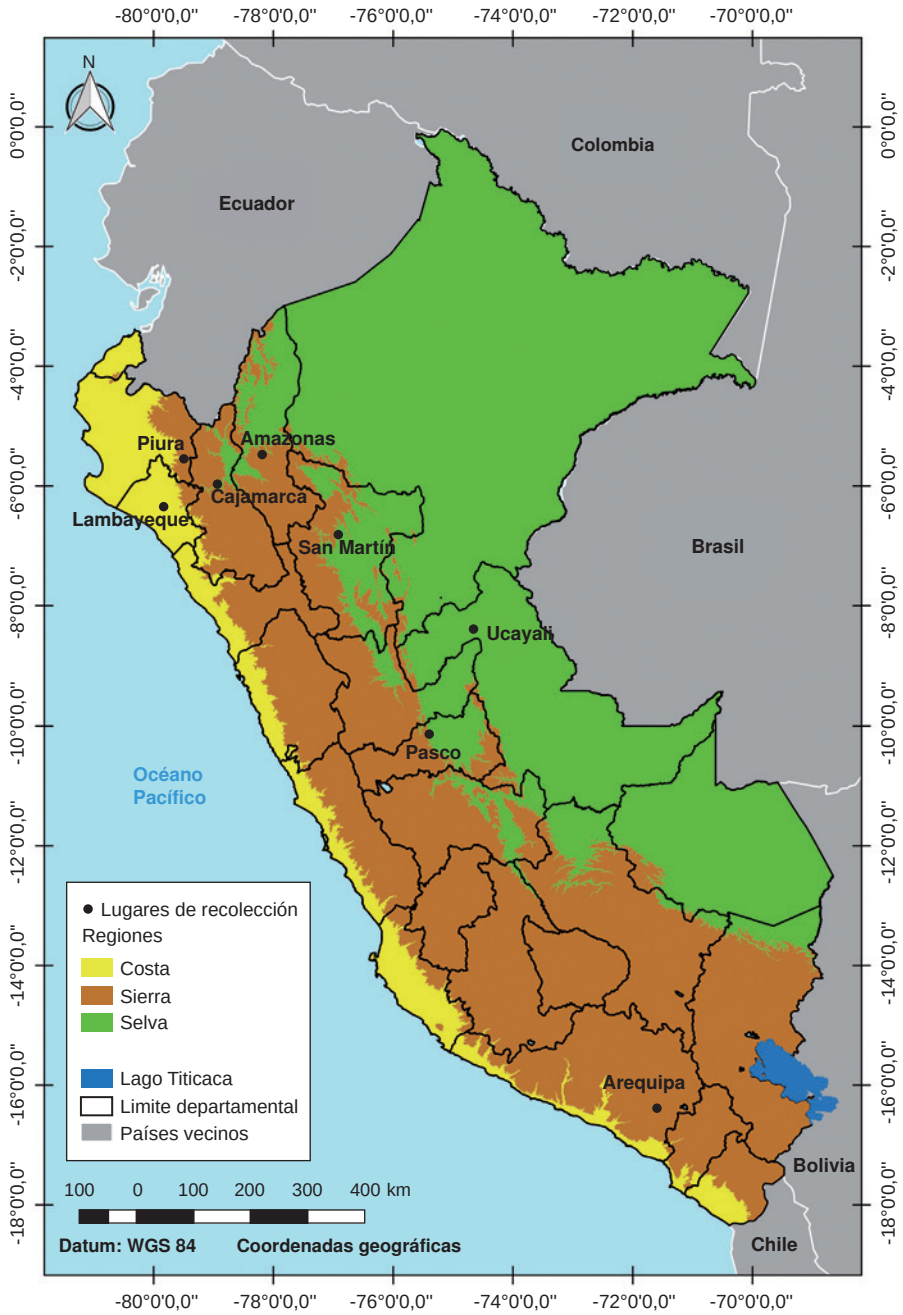


Figura 1. Regiones naturales de Perú. Se indican con (•) los departamentos donde se capturaron los 179 triatominos.

para diferenciar los linajes TcII y TcVI, se hizo una tercera PCR para la región 18Sα rRNA: la TcII arrojó un producto de 165 pb y la TcVI no generó producto, aunque algunas cepas produjeron una banda tenue de 165 pb.

Se utilizaron seis cepas de referencia internacional correspondientes a las DTU para identificar los genotipos presentes en cada vector (TcI, cepa 833; TcII, cepa Y; TcIII, cepa MT3663; TcIV, cepa José Julio; TcV, cepa 967, y TcVI, cepa CL Brener) (figuras 2 y 3). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2 % y en geles de poliacrilamida al 6 %, teñidos con Red Gel™ y nitrato de plata, respectivamente.

Resultados

De los ocho departamentos donde se capturaron las siete especies de triatominos, solamente en seis se confirmó la presencia de *T. cruzi* (Amazonas,

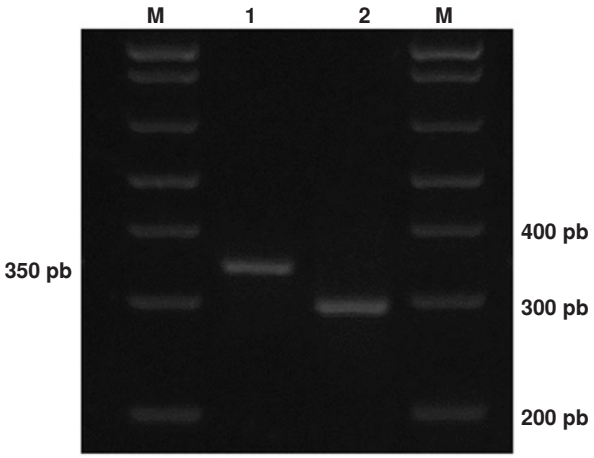


Figura 2. Gel de agarosa al 2 % teñido con RedGel™. Productos de amplificación obtenidos mediante PCR del gen miniexón con los iniciadores TCC/TCI/TC2 (34).
M: marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA); carril 1: cepas de referencia de TcI (cepa 833); carril 2: cepa de referencia de TcII (cepa Y)

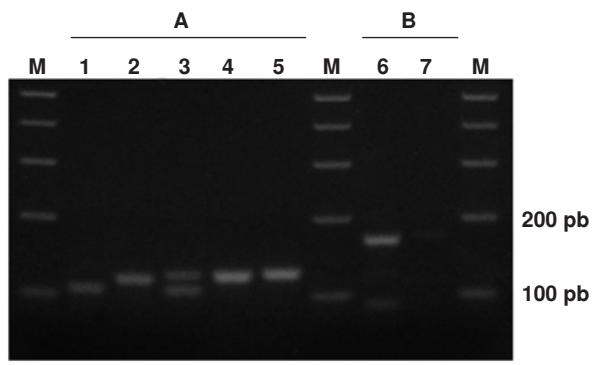


Figura 3. Gel de agarosa al 2 % teñido con Red Gel™. **A**: Productos de amplificación obtenidos mediante PCR de la región 24Sα rRNA con los iniciadores D71/D72 (35). M: marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA); 1: TcIII de la cepa de referencia MT3663; 2: TcIV cepa de referencia José Julio; 3: TcV de la cepa de referencia 967; 4: TcVI de la cepa de referencia CL Brener; 5: TcII de la cepa de referencia Y. **B.** Productos de amplificación obtenidos mediante PCR de la región 18Sα rRNA con los iniciadores V1/V2 (33). M: marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA); 6: TcII de la cepa de referencia Y; 7: TcVI de la cepa de referencia CL Brener

Arequipa, Cajamarca, Lambayeque, Pasco y Ucayali). En dichos departamentos, la prevalencia de *T. cruzi* fluctuó entre 33,3 y 100 % (cuadro 1).

Se procesaron 197 muestras de heces de triatominos utilizando los iniciadores S35/S36, y se detectaron 113 positivas para *T. cruzi* y cinco para *T. rangeli* (32). *Trypanosoma rangeli sensu lato* se detectó en el contenido intestinal de cuatro ejemplares de *P. herreri* capturados en el departamento de Amazonas y en un ejemplar de *T. carrioni* procedente del departamento de Cajamarca.

En el cuadro suplementario 1, disponible en https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3559, se presenta la información sobre especie, fecha de captura, localidad, distrito, provincia, departamento, DTU detectada, latitud, longitud y altura sobre el nivel del mar de los 113 triatominos positivos para *T. cruzi* y los cinco positivos para *T. rangeli*. Además, en el cuadro suplementario 2, disponible en https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3559, se presenta la información sobre el tipo de clima, temperatura promedio anual, precipitación anual departamental, tipo de vegetación, región ecológica y región natural de las provincias donde fueron capturados los triatominos, información obtenida del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI), Lima-Perú, con respecto a los años 2003 a 2015, y del Ministerio del Ambiente, Dirección General de Evaluación, Valoración y Financiamiento del Patrimonio Natural: Lima-MINAM, para el 2015.

En 108 de las 113 muestras positivas para *T. cruzi* procesadas mediante PCR S35/S36 fue posible caracterizar las DTU utilizando amplificación de los genes miniexón, *24Sα rRNA* y *18Sα rRNA*. Las DTU caracterizadas presentaron la siguiente distribución: 95 de TcI, cinco deTcII, cuatro de TcIII, cuatro de TcIV y cinco cuyas DTU no fueron identificadas (cuadro 2). Se observó una predominancia de la TcI en las siete especies de triatominos analizadas (*T. infestans*, *P. herreri*, *P. chinai*, *P. geniculatus*, *R. pictipes*, *R. robustus* y *T. carrioni*), cuyos ejemplares se capturaron en los departamentos de Amazonas, Arequipa, Cajamarca, Lambayeque, Pasco y Ucayali (figura 4).

La mayoría de las muestras procedentes de Arequipa correspondió a la TcI (12/13 muestras) y, además, se detectó una muestra de TcII. Por otro lado, en

Cuadro 1. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en siete especies de triatominos capturados en seis departamentos de Perú

Especie	Número de ejemplares capturados	Número de ejemplares positivos	Prevalencia (%)
P. chinai	6	2	33,3
P. geniculatus	2	1	50,0
P. herreri	157	84	53,5
R. pictipes	8	4	50,0
R. robustus	8	8	100,0
T. carrioni	3	1	33,3
T. infestans	13	13	100,0
Total	197	113	57,4

Cuadro 2. Genotipos de *Trypanosoma cruzi* detectados en siete especies de triatominos procedentes de seis departamentos de Perú

Especie	TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV	TcVI	DTU no identificada	Total
P. chinai	2	0	0	0	0	0	0	2
P. geniculatus	1	0	0	0	0	0	0	1
P. herreri	68	4	3	4	0	0	5	84
R. pictipes	4	0	0	0	0	0	0	4
*R. robus*tus	7	0	1	0	0	0	0	8
T. carrioni	1	0	0	0	0	0	0	1
T. infestans	12	1	0	0	0	0	0	13
Total	95	5	4	4	0	0	5	113

Amazonas se detectó la mayoría de las DTU, así: 49 de TcI, cuatro de TcII, tres de TcIII y cuatro de TcIV. En Cajamarca y en Ucayali, se detectó la TcI en 22 y 10 muestras, respectivamente, y la TcIII se detectó en una muestra procedente de Ucayali (cuadro 3). No se detectaron genotipos correspondientes a TcV y TcVI.

Discusión

En el tubo digestivo de 118 (60 %) de los 197 triatominos procesados, se detectaron tripanosomas, de los cuales 113 correspondieron a *T. cruzi* y cinco a *T. rangeli*. En 108 de las muestras positivas para *T. cruzi,* se logró identificar la correspondiente DTU, y cinco se determinaron como *T. cruzi sensu lato*.

En estudios previos se ha reportado que *T. rangeli* se puede discriminar en dos grupos, KP1(+) y KP1(-), con base en la presencia o ausencia del minicírculo KP1 del ADN del cinetoplasto (kDNA) (35). Además, el análisis de la subunidad pequeña del ARN ribosómico (SSU-rRNA) ha permitido identificar cinco linajes (A, B, C, D, y E) en Centroamérica y Suramérica (36,37). En el caso de las cinco muestras de *T. rangeli*, estas se determinaron como *T. rangeli sensu lato*, sin identificar el linaje correspondiente debido a la escasa concentración del ADN del parásito. La presencia de *T. rangeli* se ha reportado previamente en Perú (28,38) y algunos aislamientos de *R. ecuadoriensis* en el departamento de Cajamarca se caracterizaron como *T. rangeli* KP1(-)/C (39,40). En este último estudio, los investigadores informaron que en las especies de *Rhodnius* de la cordillera de los Andes (*R. pallescens*, *R. colombiensis*, *R*. *ecuadoriensis*) circula el genotipo *T. rangeli* KP1(-)/C. En estudios recientes en las provincias de Loja y Manabí en Ecuador, se reportó la presencia de *T. rangeli* KP1(-)/C en el intestino de *R. ecuadoriensis*, *P. howardi* y *P. rufotuberculatus* (41), lo cual indica que es posible detectar la presencia de *T. rangeli* en el intestino de especies diferentes a *Rhodnius*, tal como se documentó previamente en *P. megistus* en Santa Catarina, Brasil (35).

En el presente estudio, se reportó la presencia de *T. rangeli* en el intestino de cuatro ejemplares de *P. herreri* recolectados en Amazonas y en un ejemplar de *T. carrioni* procedente de Cajamarca. La presencia de *T. rangeli* en el intestino de los triatominos es muy frecuente en varias regiones de Latinoamérica, aunque la invasión de las glándulas salivales solo ocurre en las especies del género *Rhodnius* (42). Los genotipos de *T. rangeli* detectados en el presente trabajo en el intestino de *P. herreri* y *T. carrioni* podrían corresponder a *T. rangeli* KP1(-) (C,D,E) o a *T. rangeli* KP1(+) (A,B). Para confirmar estas posibilidades será necesario caracterizar el parásito presente en el intestino de estos vectores con la finalidad de confirmar el tipo de linaje que circula en ellos.

En un estudio previo en Perú se abordó la detección de las DTU de *T. cruzi* en un número reducido de muestras (16 aislamientos), por lo cual sus resultados no fueron concluyentes (43). En el presente estudio, en 108 de las muestras positivas para *T. cruzi* se logró identificar la correspondiente DTU y cinco se determinaron como *T. cruzi sensu lato*. Se confirmó, asimismo, que la DTU TcI (95/108=88%) predominó en las especies de los triatominos recolectados en los seis departamentos de Perú (cuadro 3). Esta situación es similar en los países centroamericanos y en los países de la región norte de Suramérica, en donde predomina *T. cruzi* I (TcI) sobre *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII) y *T. cruzi* IV (TcIV) (17,44-47).

En un estudio en Venezuela, el 94,1 % de 778 aislamientos correspondió a la TcI, mientras que la TcIV y la TcIII se detectaron en 3,1 y 2,8 % de ellos, respectivamente. En aislamientos humanos se detectaron la TcI y la TcIV en 79 y 21 % de ellos,

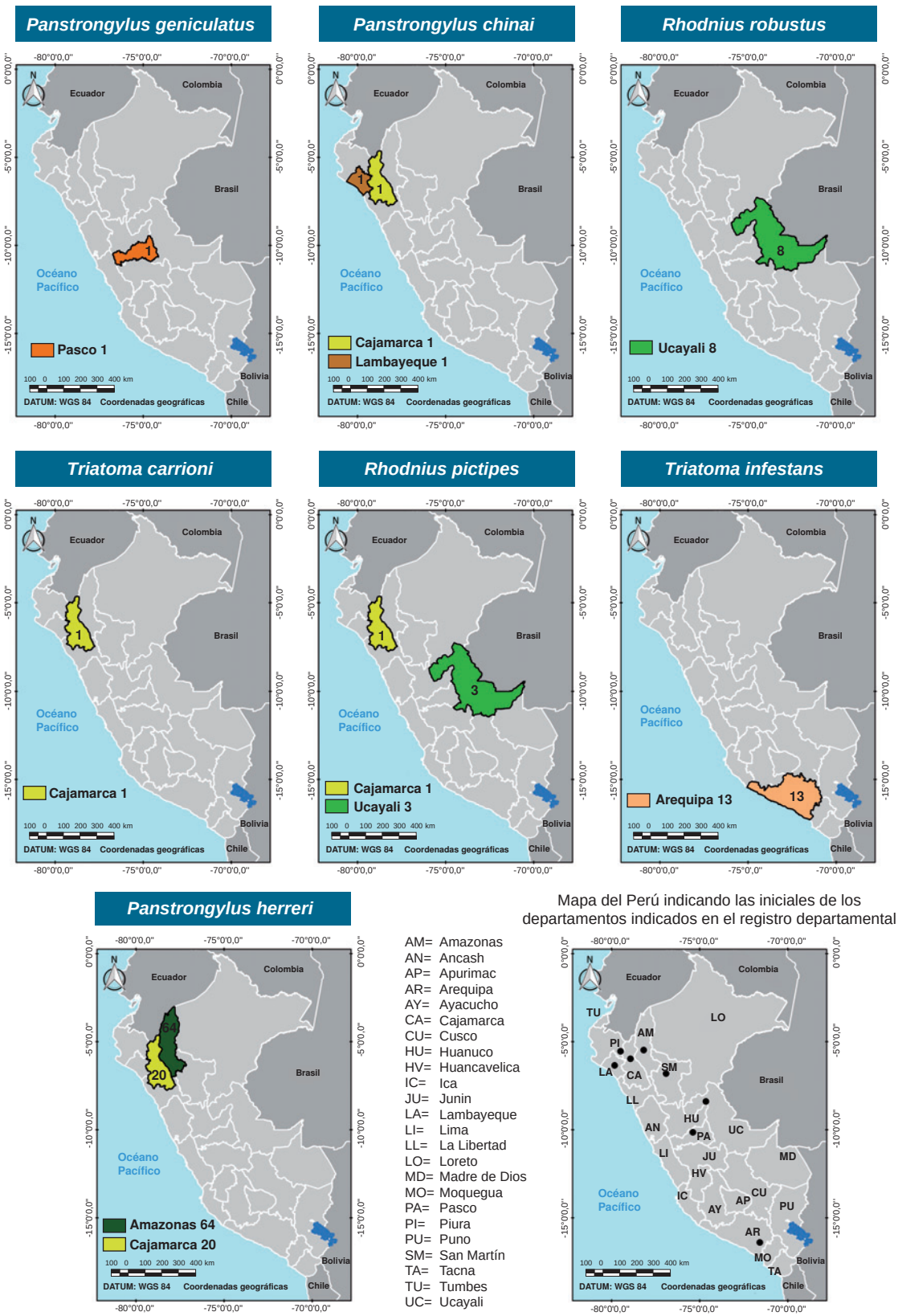


Figura 4. Distribución geográfica de 113 muestras de *Trypanosoma cruzi* de siete especies de triatominos caracterizadas mediante técnicas moleculares para la identificación de las DTU. Los números indican la cantidad de muestras positivas detectadas.

Cuadro 3. Distribución de genotipos de *Trypanosoma cruzi* por departamento en Perú

Especie	TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV	TcVI	DTU no identificada	Total
Amazonas	49	4	3	4	0	0	4	64
Arequipa	12	1	0	0	0	0	0	13
Cajamarca	22	0	0	0	0	0	1	23
Lambayeque	1	0	0	0	0	0	0	1
Pasco	1	0	0	0	0	0	0	1
Ucayali	10	0	1	0	0	0	0	11
Total	95	5	4	4	0	0	5	113

respectivamente, pero no se detectó la TcIII, en tanto que en los aislamientos de triatominos se detectaron tres linajes (TcI, TcIV y TcIII) (46). En Bolivia, 99,1 % de 333 muestras del contenido intestinal de *T. infestans* correspondió a la TcI (45), y en Chile este fue el linaje más prevalente en muestras del contenido intestinal de *T. infestans* (97,6 %), detectado en 100 % de los ejemplares recolectados en el interior de las viviendas y en 93,3 % de los ejemplares selváticos (47). La predominancia de la TcI podría estar asociada a una mayor capacidad de los vectores para transmitirla, similar a lo que se ha demostrado para *T. infestans*, especie que tiene una mayor capacidad de transmitir la TcI que la TcV y la TcII (48); asimismo, el linaje TcI tiene mayor eficiencia para infectar huéspedes (49).

Es importante señalar que en este estudio se recolectaron en algunas localidades de las provincias de Bagua y Utcubamba, departamento de Amazonas, 101 ejemplares de *P. herreri* en el interior de las viviendas, de los cuales 64 fueron positivos para *T. cruzi* (64/101; 63,4 %) y cuatro para *T. rangeli* (4/101; 4 %). Esta región (Selva) presentó la mayor variabilidad de las DTU de *T. cruzi*: TcI (49/64; 76,6 %), TcII (4/64; 6,25 %), TcIII (3/64; 4,7 %), TcIV (4/64; 6,25 %) y algunas no determinadas (5/64; 7,8 %). En estas mismas localidades de las dos provincias (Amazonas), se capturaron en años anteriores ejemplares de *P. herreri* en el peridomicilio (27).

La variabilidad de las DTU en el departamento de Amazonas podría explicarse por las características y la ubicación de las viviendas de las diversas localidades; por ejemplo, las viviendas de la localidad de El Hebrón, distrito de Cajaruro, provincia de Utcubamba (figura 5), se encontraban cerca de la floresta, y 90 % de ellas estaban construidas con material favorable para la colonización de triatominos (paredes de adobe, techo de calamina, sin piso asfaltado y paredes externas e internas sin



Figura 5. Localidad de El Hebrón, distrito de Cajaruro, provincia de Utcubamba, departamento de Amazonas

estucar). Asimismo, en el interior de las viviendas había cuyes (*Cavia porcellus*) y en los alrededores con frecuencia se observaban perros y gatos, así como corrales para aves y cerdos. Precisamente en esta localidad se detectaron cinco DTU de TcI, tres de TcII, dos de TcIII y dos de TcIV, lo cual indica la gran variabilidad de las DTU de *T. cruzi* en esta región. Sin duda, en la floresta de El Hebrón los animales silvestres visitan durante la noche los alrededores de las viviendas con la finalidad de alimentarse de frutas y ubicar sus presas. En los alrededores de las viviendas se ha observado la presencia de *P. herreri* y, por lo tanto, existe la probabilidad de que estos triatominos se alimenten tanto de animales silvestres como de los domésticos.

En el presente estudio, se capturaron ejemplares de *P. herreri* en el interior de las viviendas, pero en estudios previos se han capturado ejemplares de esta especie también en el peridomicilio (27). Estas observaciones sugieren la coexistencia en esta zona de los ciclos de transmisión doméstica, peridoméstica y silvestre; no obstante, es necesario verificar esta hipótesis en futuros proyectos. Los resultados de este estudio en la selva amazónica peruana coinciden con los de otros estudios de caracterización de *T. cruzi* aislado de vectores y

reservorios de la Amazonia brasilera, donde se ha documentado la presencia de *T. cruzi* I, *T. cruzi* III y *T. cruzi* IV (50,51).

En el departamento de Ucayali (Selva), se recolectaron en el interior de las viviendas ocho ejemplares de *R. robustus* y tres de *R. pictipes*. Estas dos especies son estrictamente silvestres, por lo que este hecho constituye una evidencia de su comportamiento intrusivo de las viviendas humanas. Las viviendas de las localidades de El Porvenir-Cashibo y San José, distrito de Campo Verde, provincia de Coronel Portillo, se ubicaban en la floresta de bosque secundario (a unos 5 a 10 m), poblado de palmeras, árboles y arbustos (figura 6), y sus paredes eran de madera, el techo de hojas de palmeras y el piso de tierra. Cada vivienda constaba de dos a tres ambientes; en los alrededores se criaban aves de corral y cerdos, y en el interior de las viviendas, cuyes. Sobre los árboles circundantes ocasionalmente se observó la presencia de animales silvestres (monos tití).

Por otro lado, algunas viviendas de la localidad de Misión Suiza del Perú, distrito de Campo Verde, provincia de Coronel Portillo (Amazonas), se ubicaban en las cercanías o a 100 m del bosque secundario, caracterizado por la presencia de palmeras, árboles y unos pocos arbustos. Las viviendas allí también eran de materiales favorables para los triatominos (paredes de madera, la mayoría con techo de hojas de palmeras y ramas de árboles, y pocas con techo de eternit o calamina) (figura 7), y se acostumbraba la cría de aves de corral. Por las características de las viviendas y por las especies de triatominos capturados en esas localidades, se puede concluir que no se daba el ciclo de transmisión doméstica o peridoméstica, y que el ciclo silvestre llegaba hasta las viviendas humanas con la intrusión de *R. robustus* y *R. pictipes*. En la localidad de El Porvenir-Cashibo, se detectó la presencia de TcI en siete ejemplares de *R. robustus* y en tres de *R. pictipes*, y en uno de *R. robustus*, la de TcIII.

En el departamento de Cajamarca (Sierra), se recolectaron 54 ejemplares de *P. herreri*, de los cuales 20 (20/54; 37,04 %) resultaron positivos para *T. cruzi,* y en 19 (19/20; 95 %) se identificó la TcI, en tanto que en un ejemplar (1/20; 5 %) no se logró identificar la DTU. Estos resultados sugieren que en las cuatro localidades de los dos distritos de la provincia de Cutervo (Cajamarca), de donde procedían los triatominos, la transmisión de *T. cruzi*



Figura 6. Viviendas ubicadas en las localidades de El Porvenir-Cashibo y San José, distrito Campo Verde, provincia del Coronel Portillo, departamento de Ucayali



Figura 7. Viviendas ubicadas en la localidad de Misión Suiza del Perú, distrito Campo Verde, provincia del Coronel Portillo, departamento de Ucayali

era doméstica. *Panstrongylus herreri* es un triatomino doméstico, pues todo su ciclo biológico lo desarrolla en el interior de las viviendas (27), pero también hay presencia de animales domésticos, como cuyes, perros y gatos, que constantemente se desplazan de un ambiente a otro de la vivienda donde se encuentran los estadios inmaduros y adultos de *P. herreri* que así tienen la oportunidad de alimentarse de dichos animales.

En la misma provincia de Cutervo (Cajamarca), pero en localidades pertenecientes a distritos diferentes, en numerosas oportunidades se han capturado ejemplares de *P. herreri* en ambientes domésticos, peridomésticos y silvestres, aunque en estos dos últimos ambientes el número de las capturas fue menor que en el interior de las viviendas; asimismo, se ha informado la presencia de tripanosomas en las heces de *P. herreri* (Sara Castro y Deysi Luna-Caipo, comunicación personal, 15 de marzo de 2016). Por ello, es necesario y prioritario evaluar los triatominos existentes en los ambientes peridomésticos y silvestres para determinar con exactitud el tipo de transmisión del parásito en las áreas de estudio y, a la vez, determinar las DTU circulantes.

Por las limitaciones del muestreo, en este estudio solo se examinó un ejemplar de *P. chinai* proveniente de la costa norte, de la localidad de La Peña, distrito de Salas, provincia de Lambayeque (Lambayeque), y en él se detectó *T. cruzi* I. Las referencias bibliográficas indican que se han observado *T. cruzi* mediante microscopía en ejemplares de *P. chinai* y *R. ecuadoriensis* capturados en Tumbes, Piura, Lambayeque, La Libertad y Ancash en la costa norte (52-55). Se han encontrado varios ejemplares de *R. ecuadoriensis* procedentes de la costa de Piura y de La Libertad infectados naturalmente con *T. rangeli* (28,38,56) y, en estudios posteriores con cepas de *T. rangeli* aisladas de ejemplares procedentes del departamento de La Libertad, se encontró el genotipo *T. rangeli* KP1 (-)/C (39,40).

En la costa sur (Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna), *T. infestans* es el único triatomino presente. En algunas localidades de la costa de las provincias de Ica, Palpa y Nazca, departamento de Ica, se recolectan con frecuencia ejemplares de *T. infestans* infectados naturalmente con *T. cruzi* (57); sin embargo, en los estudios no se menciona la caracterización de las DTU.

Entre 2012 y 2014, se capturaron ejemplares de *T. infestans* en el domicilio y el peridomicilio, en localidades de la costa de la provincia de Caraveli, departamento de Arequipa; sin embargo, no se ha detectado *T. cruzi* en estos especímenes mediante microscopía (Nancy Ruelas-Llerena, comunicación personal, marzo de 2016, y Fernando Málaga Chávez, comunicación personal, 8 de abril de 2016). Esto mismo sucede con los ejemplares de *T. infestans* de la costa de los departamentos de Moquegua y Tacna (Miriam Guzmán Loayza y Javier Villanueva Roque, comunicación personal, 10 de abril de 2016).

En estudios recientes sobre la variabilidad de *T. cruzi* I en Colombia, se detectaron dos genotipos claramente diferenciados denominados *T. cruzi* I doméstico (asociado a *R. prolixus* doméstico) y *T. cruzi* I selvático (asociado a ejemplares silvestres de *R. pallescens* y *R. colombiensis*) (58). Esta misma diferenciación molecular se observó en 101 aislamientos de *T. cruzi* I en ese país, pues en 70 % de ellos se encontró la TcI selvática y, en 30 %, la TcI doméstica (59). El genotipo selvático se ha asociado con los casos agudos de transmisión vectorial en áreas selváticas y en casos de transmisión oral por contaminación de alimentos (58). Aunque en Perú se documentó un primer caso de enfermedad aguda de Chagas por transmisión vectorial de *T. cruzi,* en el cual se implicó *P. geniculatus* (29), es muy importante confirmar si en el país están presentes estos mismos genotipos de *T. cruzi* I, denominados *T. cruzi* I doméstico y *T. cruzi* I selvático (58), lo cual permitirá obtener información sobre la epidemiología de *T. cruzi* en Perú y confirmar si eventuales casos de enfermedad de Chagas aguda pudieran estar asociados a los genotipos silvestres de *T. cruzi* I, como ya se reportó en Colombia (58).

En este trabajo se documentó la presencia de *T. cruzi* en vectores procedentes de zonas endémicas de Perú, entre ellos, *P. herreri*, *T. infestans*,

P. chinai, *P. geniculatus*, *R. pictipes*, *R. robustus* y *T. carrioni.* Las DTU presentes en el intestino de estos vectores de importancia epidemiológica se caracterizaron y se determinó que la TcI fue la más abundante, y que la TcII, la TcIII y la TcIV fueron menos frecuentes. La información presentada contribuye a una mejor comprensión de la dinámica de transmisión vectorial de *T. cruzi* en Perú.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica de Perú (CONCYTEC), por la subvención económica proporcionada a Carlos Padilla para su pasantía en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia, donde se hicieron los estudios moleculares para la tipificación de las DTU de *T. cruzi*. Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (Colciencias) y al Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima en ese país, por la financiación parcial de la tipificación de *T. cruzi*.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica de Perú (CONCYTEC), por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, de Colombia (contrato 110551929038), y por el Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima de ese país.

Referencias

1. **World Health Organization.** Chagas disease (American trypanosomiasis). Fecha de consulta: 10 de enero de 2015. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/.
2. **Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA.** Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. Biomédica. 2014;34:631-41. httsp://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2204
3. **Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.*** A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommendsTcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1051-4. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021
4. **Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, *et al.*** The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012;12:240-53. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009
5. **Marcili A, Lima L, Cavazzana MJ, Junqueira AC, Veludo HH, Maia da Silva F, *et al*.** A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. 2009;136:641-55. https://doi.org/10.1017/S0031182009005861
6. **Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM.** TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panamá Canal Zone, with comments on its classification and the use of the *18S rRNA* gene for lineage identification. Infect Genet Evol. 2012;12:1328-32. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.013
7. **Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, *et al*.** Trypanosome species in neotropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. Infect Genet Evol. 2014;22:250-6. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.022
8. **Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, *et al*.** Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 2015;151:166-77. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015
9. **Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, *et al.*** Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions of Colombia. Infect Genet Evol. 2007;7:535-9. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.12.003
10. **Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, *et al*.** Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathog. 2009;5:e1000410. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410
11. **Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marín-Neto JA, Morillo CA.** Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e899. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000899
12. **Mantilla JC, Zafra GA, Macedo AM, González CI.** Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. Hum Pathol. 2010;41:610-3. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.11.005
13. **Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J.** American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012;26:275-91. https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002
14. **Monje-Rumi MM, Pérez-Brandán C, Ragone PG, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti-D'Amato AM*, et al.*** *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: Mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. Infect Genet Evol. 2015;29:53-9. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.001
15. **Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, *et al.*** *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. Int J Parasitol. 2010;40:1599-607. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.006

16. **Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, *et al.*** Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. Int J Parasitol. 2005;35:225-33. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.024

17. **Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Herrera C, Urrea DA, Falla A, *et al.*** *Trypanosoma cruzi* population variability in Colombia: Possible co-evolution in different vector species. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(Supl.II):27-34.

18. **Wiesenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR.** Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics. 2005;171:527-43. https://doi.org/10.1534/genetics.104.038745

19. **García ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA.** Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 2010;20:499-505. https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.07.003

20. **Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA.** Triatominae-*Trypanosoma cruzi-T. rangeli*: Vector-parasite interactions. Acta Trop. 2009;110:137-47. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.001

21. **Castro DP, Moraes CS, González MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, García ES.** *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. PLoS One. 2012;7:e36591. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036591

22. **Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades Dr. Daniel Olaechea.** Boletín epidemiológico. Semana epidemiológica 52 de 2014. Fecha de consulta: 15 de enero de 2015. Disponible en: http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2014/52.pdf

23. **Alroy KA, Huang C, Gilman RH, Quispe-Machaca VR, Marks MA, Ancca-Juárez J, *et al.*** Prevalence and transmission of *Trypanosoma cruzi* in people of rural communities of the high jungle of northern Perú. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:e0003779. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003779

24. **Chávez J.** Contribución al estudio de los triatominos del Perú: distribución geográfica, nomenclatura y notas taxonómicas. An Fac Med Lima. 2006;67:65-76.

25. **Elliot A, Cáceres I, Guillén Z, Nakashima I.** Identificación de los chinches triatominos (Hemiptera, Reduviidae) conocidos del Perú. Rev Per Ent. 1988;31:18-20.

26. **Guillén Z, Cáceres I, Elliot A, Ramírez J.** Triatominos del norte peruano y su importancia como vectores de *Trypanosoma s*pp. Rev Per Ent. 1989;31:25-30.

27. **Cáceres GA, Troyes L, Gonzáles-Pérez A, Llontop E, Bonilla C, Murias E, *et al.*** Enfermedad de Chagas en la región nororiental del Perú. I. Triatominos (Hemiptera, Reduviidae) presentes en Cajamarca y Amazonas. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2002;19:17-23.

28. **Cuba CA, Abad-Franch F, Roldán J, Vargas F, Pollack L, Miles MA.** The triatomines of northern Perú, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:175-183. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000200005

29. **Vega S, Mendoza A, Cabrera R, Cáceres GA, Campos E, Ancca J, *et al.*** Primer caso de enfermedad de Chagas aguda en la Selva Central del Perú: investigación de colaterales, vectores y reservorios. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2006;23:288-92.

30. **Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD.** Chagas disease: Role of parasite genetic variation in pathogenesis. Expert Rev Mol Med. 2002;4:1-16. https://doi.org/10.1017/S1462399402004118

31. **Lent H, Wygodzinsky P.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Am Mus Nat His.1979;163:123-520.

32. **Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM.** Species-specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. 1999;72:203-12. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00085-0

33. **Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M.** Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int J Parasitol. 2001;31:1218-26. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00238-7

34. **Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B.** DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1996;83:141-52. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7

35. **Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, *et al.*** KDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. Acta Tropica. 2002;81:77-82. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00186-3

36. **Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, *et al.*** Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol Ecol. 2007;16:3361-73. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03371.x

37. **Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana M Jr, Ortiz PA, Campaner M, *et al*.** *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. Acta Trop. 2009;109:199-207. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.11.005

38. **Cuba CA, Vallejo GA, Gurgel-Gonçalves R.** Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) prevalent in the northwest of Perú: Species with epidemiological vectorial capacity. Parasitol Latinoam. 2007;62:154-64. https://doi.org/10.4067/S0717-77122007000200009

39. **Urrea DA, Carranza JC, Cuba-Cuba CA, Gurgel-Gonçalves R, Guhl F, Schofield CJ, *et al*.** Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Perú, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panamá, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. Infect Genet Evol. 2005;5:123-9. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.07.005

40. **Urrea DA, Herrera CP, Falla A, Carranza JC, Cuba-Cuba C, Triana-Chávez O, *et al.*** Sequence analysis of the spliced-leader intergenic region (SL-IR) and random amplified

polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. Acta Trop. 2011;120:59-66. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.016

41. **Ocaña-Mayorga S, Aguirre-Villacis F, Pinto C, Vallejo GA, Grijalva M.** High prevalence and low genetic diversity of *Trypanosoma rangeli* in sylvatic *R. ecuadoriensis* and mammal hosts. Vector Borne Zoonotic Dis. 2015;15:732-42. https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1794

42. **Vallejo GA, Suárez Y, Olaya JL, Gutiérrez SA, Carranza JC.** *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Rev Acad Colomb Cienc Ex Fis Nat. 2015;39:111-22.

43. **Ancca J, Vega S, Pinto J, Naquira C.** Caracterización genética de *Trypanosoma cruzi* aislados de triatominos de áreas endémicas a la enfermedad de Chagas en el Perú. Rev Ibero Latinoam Parasitol. 2009;1:8-14.

44. **Guhl F, Ramírez JD.** Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. Infect Genet Evol. 2013;20:148-54. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.028

45. **Brenière SF, Aliaga C, Waleckx E, Buitrago R, Salas R, Barnabé C, *et al.*** Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of TcI. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1650. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001650

46. **Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, *et al.*** Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1707. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001707

47. **Bacigalupo A, Segovia V, García A, Botto-Mahan C, Ortiz S, Solari A, *et al.*** Differential pattern of infection of sylvatic nymphs and domiciliary adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* genotypes in Chile. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:473-80. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0237

48. **de Lana M, da Silveira Pinto A, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M.** *Trypanosoma cruzi*: Compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. Exp Parasitol. 1998;90:20-5. https://doi.org/10.1006/expr.1998.4304

49. **Galuppo S, Bacigalupo A, García A, Ortiz S, Coronado X, Cattan PE, *et al.*** Predominance of *Trypanosoma cruzi* genotypes in two reservoirs infected by sylvatic *Triatoma infestans* of an endemic area of Chile. Acta Trop. 2009;111:90-3. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.02.010

50. **Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa MD.** *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. Trop Med Int Health. 2010;15:1049-51. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02577

51. **Monteiro WM, Teston AP, Gruendling AP, dos Reis D, Gomes ML, de Araújo SM, *et al.*** *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2013.7: e2069. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002069

52. **Calderón-Falero G.** Chinches triatominos (Hemiptera: Reduviidae) de la región Grau, Perú. Rev Per Ent. 1996;38:19-22.

53. **Guillén Z, Cáceres I, Elliot A.** Los triatominos (Hemiptera, Reduviide) de la zona Centro del Perú. Rev Per Med Trop UNMSM. 1992;6:89-91.

54. **Jara CA, Escalante H, Roldán J, Díaz-Lima E.** Distribución y frecuencia de infección por *Trypanosoma cruzi* de triatominos y *Ovis aries* en el Valle de Chamán, La Libertad, Perú. Sciendo. 1998;1:23-31.

55. **Llanos B.** Hallazgo en el Perú de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León, 1958, naturalmente infectado por *Trypanosoma cruzi*. Nota preliminar. Arch Per Pat Clin. 1961;15:133-40.

56. **Cuba-Cuba AC, Vargas F, Roldán J, Ampuero C.** Domestic *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera, Reduviidad) infestation in Northern Perú: A comparative trial of detection methods during a six-month follow-up. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:85-90. https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000200006

57. **Solís H, De Carvalho E, Ferreira C, Casanova C, Huamán A, Mendoza V.** Contribución al estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en tres localidades de la zona Sur del Perú. An Fac Med Lima. 2003;64:223-7.

58. **Villa LM, Guhl F, Zabala D, Ramírez JD, Urrea DA, Hernández DC, *et al*.** The identification of two *Trypanosoma cruzi* I genotypes from domestic and sylvatic transmission cycles in Colombia based on a single polymerase chain reaction amplification of the spliced-leader intergenic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:932-35. https://doi.org/10.1590/0074-0276130201

59. **León CM, Hernández C, Montilla M, Ramírez JD.** Retrospective distribution of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:387-93. https://doi.org/10.1590/0074-02760140402

Cuadro suplementario 1. Base de datos con la información geográfica del sitio de captura de 113 triatominos infectados con diferentes DTU de *Trypanosoma cruzi* y de cinco triatominos infectados con *Trypanosoma rangeli*

Nº	Especie	Fecha	Localidad	Distrito	Provincia	Departamento	DTU	Latitud G°M'S"	Longitud G°M'S"	Altitud msnm
1	*P. herreri*	2013	Chirimoyo	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 37,453" S	78°58' 6,743" O	1.469
2	*P. herreri*	2013	Chirimoyo	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 37,453" S	78°58' 6,743" O	1.469
3	*P. herreri*	2013	Chirimoyo	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 37,453" S	78°58' 6,743" O	1.469
4	*P. herreri*	2013	Chirimoyo	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 37,453" S	78°58' 6,743" O	1.469
5	*P. herreri*	2013	Chirimoyo	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 37,453" S	78°58' 6,743" O	1.469
6	*P. herreri*	2013	Chirimoyo	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 37,453" S	78°58' 6,743" O	1.469
7	*P. herreri*	2013	Chirimoyo	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 37,453" S	78°58' 6,743" O	1.469
8	*P. herreri*	2013	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	TC*	5°28' 28,305" S	78°27' 39,059" O	927
9	*P. geniculaus*	2013	Pozuzo	Pozuzo	Oxapama	Pasco	TcI	10°3' 55,552" S	75°33' 25,244" O	956
10	*P. herreri*	2013	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°28' 28,305" S	78°27' 39,059" O	927
11	*P. herreri*	2013	Sol Naciente	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°27' 25,000" S	78°27' 27,000" O	922
12	*P. herreri*	2013	Copallin	Aramango	Bagua	Amazonas	TcIII	5°27' 35,000" S	78°27' 35,000" O	953
13	*P. herreri*	2013	Campo Bonito	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°30' 19,000" S	78°26' 53,000" O	895
14	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
15	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
16	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
17	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
18	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
19	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
20	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
21	*T. infestans*	2006	F. Belaunde Terry	Quequeña	Arequipa	Arequipa	TcI	16°33' 29,000" S	71°27' 4,000" O	2.551
22	*P. herreri*	2013	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°28' 28,305" S	78°27' 39,059" O	927
23	*P. herreri*	2013	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°28' 28,305" S	78°27' 39,059" O	927
24	*P. herreri*	2013	Capallin - Aramango	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°27' 35,000" S	78°27' 35,000" O	953
25	*P. herreri*	2013	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°28' 28,305" S	78°27' 39,059" O	927
26	*P. herreri*	2013	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°28' 28,305" S	78°27' 39,059" O	927
27	*P. herreri*	2013	Copallin - Aramango	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°27' 35,000" S	78°27' 35,000" O	953
28	*P. herreri*	2013	Sinchimache	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 52,000" S	78°57' 28,000" O	1.847
29	*P. herreri*	2013	Campo Bonito	Aramango	Bagua	Amazonas	TC*	5°30' 19,000" S	78°26' 53,000" O	895
30	*P. herreri*	2013	Sinchimache	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 52,000" S	78°57' 28,000" O	1.847
31	*P. herreri*	2013	Sinchimache	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 52,000" S	78°57' 28,000" O	1.847
32	*P. herreri*	2013	La Fortuna	Aramango	Bagua	Amazonas	TcI	5°28' 53,000" S	78°27' 25,000" O	969
33	*P. herreri*	2013	Sinchimache	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 52,000" S	78°57' 28,000" O	1.847
34	*P. herreri*	2013	Sinchimache	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 52,000" S	78°57' 28,000" O	1.847
35	*R. pictipes*	2013	Sinchimache	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°16' 52,000" S	78°57' 28,000" O	1.847
36	*P. herreri*	2013	San Juan de Dios	Callayuc	Cutervo	Cajamarca	TC*	6°13' 57,369" S	78°54' 10,723" O	1.764
37	*P. herreri*	2013	Naranjito de Camse	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°19' 18,000" S	78°53' 48,000" O	1.981
38	*P. herreri*	2013	San Juan de Dios	Callayuc	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°13' 57,369" S	78°54' 10,723" O	1.764
39	*P. herreri*	2013	Naranjito de Camse	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°19' 18,000" S	78°53' 48,000" O	1.981
40	*P. herreri*	2013	Naranjito de Camse	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°19' 18,000" S	78°53' 48,000" O	1.981
41	*P. herreri*	2013	Naranjito de Camse	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°19' 18,000" S	78°53' 48,000" O	1.981
42	*T. carrioni*	2013	Naranjito de Camse	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°19' 18,000" S	78°53' 48,000" O	1.981
43	*P. herreri*	2013	San Juan de Dios	Callayuc	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°13' 57,369" S	78°54' 10,723" O	1.764
44	*P. herreri*	2013	San Juan de Dios	Callayuc	Cutervo	Cajamarca	TcI	6°13' 57,369" S	78°54' 10,723" O	1.764
45	*P. chinai*	2013	Chilete	Chilete	Contumaza	Cajamarca	TcI	7°13' 21,000" S	78°50' 23,000" O	870
46	*T. infestans*	2006	Ricardo Palma	J.L. Bustamante	Arequipa	Arequipa	TcI	16°25' 36,000" S	71°31' 26,000" O	2.339
47	*T. infestans*	2006	Ricardo Palma	J.L. Bustamante	Arequipa	Arequipa	TcI	16°25' 36,000" S	71°31' 26,000" O	2.339
48	*T. infestans*	2006	Simón Bolívar	J.L. Bustamante	Arequipa	Arequipa	TcI	16°25' 11,423" S	71°31' 55,374" O	2.316
49	*T. infestans*	2006	Simón Bolívar	J.L. Bustamante	Arequipa	Arequipa	TcI	16°25' 11.423" S	71°31' 55,374" O	2.316
50	*P. herreri*	2011	San Antonio	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 43,000" S	78°15' 36,000" O	881
51	*P. herreri*	2011	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
52	*P. herreri*	2011	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
53	*P. herreri*	2011	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
54	*P. herreri*	2011	Diamante Bajo	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°42' 12,000" S	78°20' 47,000" O	1.018
55	*P. herreri*	2011	Diamante Bajo	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°42' 12,000" S	78°20' 47,000" O	1.018
56	*P. herreri*	2011	Diamante Bajo	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°42' 12,000" S	78°20' 47,000" O	1.018
57	*P. herreri*	2011	Diamante Bajo	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°42' 12,000" S	78°20' 47,000" O	1.018
58	*P. herreri*	2011	San Antonio	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 43,000" S	78°15' 36,000" O	881
59	*P. herreri*	2011	San Antonio	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 43,000" S	78°15' 36,000" O	881
60	*P. herreri*	2011	Madre de Dios	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°43' 30,000" S	78°15' 24,000" O	1.047
61	*P. herreri*	2011	Diamante Bajo	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°42' 12,000" S	78°20' 47,000" O	1.018
62	*P. herreri*	2011	Diamante Bajo	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°42' 12,000" S	78°20' 47,000" O	1.018
63	*P. herreri*	2011	Diamante Bajo	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°42' 12,000" S	78°20' 47,000" O	1.018
64	*P. herreri*	2011	Lucero	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°41' 31,000" S	78°22' 6,000" O	1.158
65	*P. herreri*	2011	El Ron	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°45' 12,000" S	78°15' 18,000" O	912
66	*P. herreri*	2011	Tres Marías	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 23,000" S	78°14' 16,000" O	1.254
67	*P. herreri*	2011	Tres Marías	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 23,000" S	78°14' 16,000" O	1.254
68	*P. herreri*	2011	El Ron	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°45' 12,000" S	78°15' 18,000" O	912
69	*P. herreri*	2011	Tres Marías	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 23,000" S	78°14' 16,000" O	1.254
70	*P. herreri*	2011	Santa Clara	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 9,000" S	78°21' 7,000" O	1.314
71	*P. herreri*	2011	Lirio de los Valles	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 56,000" S	78°22' 34,000" O	969
72	*P. herreri*	2011	Culquinmala	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 9,000" S	78°23' 20,000" O	1.001
73	*P. herreri*	2011	Madre de Dios	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°43' 30,000" S	78°15' 24,000" O	1.047
74	*P. herreri*	2011	Madre de Dios	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°43' 30,000" S	78°15' 24,000" O	1.047
75	*P. herreri*	2011	Madre de Dios	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°43' 30,000" S	78°15' 24,000" O	1.047
76	*P. herreri*	2011	Santa Clara	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 9,000" S	78°21' 7,000" O	1.314
77	*R. robustus*	2009	El Porvenir	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°24' 22,317" S	74°46' 17,829" O	153
78	*R. robustus*	2009	El Porvenir	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°24' 22,317" S	74°46' 17,829" O	153
79	*R. pictipes*	2009	El Porvenir	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°24' 22,317" S	74°46' 17,829" O	153
80	*R. robustus*	2009	El Porvenir	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcIII	8°24' 22,317" S	74°46' 17,829" O	153
81	*R. robustus*	2009	El Porvenir	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°24' 22,317" S	74°46' 17,829" O	153
82	*R. pictipes*	2009	El Porvenir	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°24' 22,317" S	74°46' 17,829" O	153
83	*R. robustus*	2009	El Porvenir	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°24' 22,317" S	74°46' 17,829" O	153
84	*R. robustus*	2009	San José	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°26' 7,617" S	74°45' 22,500" O	148
85	*R. robustus*	2009	San José	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°26' 7,617" S	74°45' 22,500" O	148
86	*R. pictipes*	2009	Misión Suiza del Perú	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°25' 6,705" S	74°41' 50,180" O	149
87	*R. robustus*	2009	Misión Suiza del Perú	Campo Verde	Coronel Portillo	Ucayali	TcI	8°25' 6,705" S	74°41' 50,180" O	149
88	*P. herreri*	2009	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcII	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
89	*P. herreri*	2009	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcIII	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
90	*P. herreri*	2009	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,00" S	78°18' 21,000" O	940
91	*P. herreri*	2009	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcII	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
92	*P. herreri*	2009	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
93	*P. herreri*	2009	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
94	*P. herreri*	2009	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcIV	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
95	*P. herreri*	2005	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcII	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
96	*P. herreri*	2005	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcIII	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
97	*P. chinai*	2009	La Peña	Salas	Lambayeque	Lambayeque	TcI	6°18' 26,000" S	79°38' 2,000" O	117
98	*P. herreri*	1998	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
99	*T. infestans*	1995	Aplao	Aplao	Castilla	Arequipa	TcII	16°7' 3,936" S	72°39' 45,833" O	1.503
100	*P. herreri*	1995	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcIV	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
101	*P. herreri*	2011	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TC*	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
102	*P. herreri*	2011	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TC*	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
103	*P. herreri*	2011	El Hebrón	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 2,000" S	78°18' 21,000" O	940
104	*P. herreri*	2011	San Antonio	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 43,000" S	78°15' 36,000" O	881
105	*P. herreri*	2011	San Antonio	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°44' 43,000" S	78°15' 36,000" O	881
106	*P. herreri*	2011	San Antonio	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcII	5°44' 43,000" S	78°15' 36,000" O	881
107	*P. herreri*	2011	El Ron	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcIV	5°45' 12,000" S	78°15' 18,000" O	912
108	*P. herreri*	2011	El Ron	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcIV	5°45' 12,000" S	78°15' 18,000" O	912
109	*P. herreri*	2011	Santa Clara	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 9.000" S	78°21' 7,000" O	1.314
110	*P. herreri*	2011	Culquinmala	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 9,000" S	78°23' 20,000" O	1.001
111	*P. herreri*	2011	Lirio de los Valles	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 56,000" S	78°22' 34,000" O	969
112	*P. herreri*	2011	Lirio de los Valles	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°40' 56,000" S	78°22' 34,000" O	969
113	*P. herreri*	2011	Madre de Dios	Cajaruro	Utcubamba	Amazonas	TcI	5°43' 30,000" S	78°15' 24,000" O	1.047
1	*P. herreri*	2013	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	*T. rangeli*	5°28' 28.305" S	78°27' 39,059" O	927
2	*P. herreri*	2913	La Palma	Aramango	Bagua	Amazonas	*T. rangeli*	5°28' 28,305" S	78°27' 39,059" O	927
3	*P. herreri*	2013	Campo Bonito	Aramango	Bagua	Amazonas	*T. rangeli*	5°30' 19,000" S	78°26' 53,000" O	895
4	*T. carrioni*	2013	Naranjito de Camse	Cutervo	Cutervo	Cajamarca	*T. rangeli*	6°23' 52,456" S	78°53' 31,649" O	2.193
5	*P. herreri*	2014	Salazar	Santa Catalina	Luya	Amazonas	*T. rangeli*	6°5' 1,250" S	78°5' 40,737" O	2.475

TC* : DTU no caracterizada

Cuadro suplementario 2. Base de datos con información sobre clima, temperatura, precipitación y cobertura vegetal de las provincias donde se capturaron los triatominos estudiados

Departamento	Provincia	Tipo de clima	Temperatura promedio anual a nivel departamental	Precipitación total anual a nivel departamental	Tipo de vegetación	Región ecológica	Región natural
Amazonas	Utcubamba	1. Zona de clima semiseco, cálido, con deficiencia de lluvia en otoño, invierno y primavera, con humedad relativa calificada como húmeda 2. Zona de clima semiseco, templado, con deficiencia de lluvia en otoño e invierno, con humedad relativa calificada como húmeda	15,1	1070	1. Áreas sin presencia de bosque amazónico 2. Bosque de montaña montano	Selva alta,clima muy variado Las lluvias pueden superar los 3.000 milímetros anuales	1. Rupa-Rupa De 400 y 1.000 msnm 2. Quechua De 2.300 a 3.500 msnm
	Bagua	Zona de clima cálido, muy lluvioso, precipitaciones abundantes en todas las estaciones del año, humedad relativa calificada como muy húmeda			Bosque de montaña	Bosque seco ecuatorial Temperatura promedio anual de 23° y 24° C Prolongada estación seca anual que puede extenderse nueve meses del año	Rupa-Rupa De 400 y 1.000 msnm
Cajamarca	Cutervo	1. Zona de clima semiseco, cálido, con deficiencia de lluvia en otoño, invierno y primavera, con humedad relativa calificada como húmeda. 2. Zona de clima templado, lluvioso, con lluvia deficiente en invierno, con humedad relativa calificada como húmeda	15,4	772,2	1. Matorral arbustivo 2. Agricultura costera y andina	Selva alta, clima muy variado Las lluvias pueden superar los 3.000 milímetros anuales	1. Yunga De 500 a 2.300 msnm y también de 1.000 a 2.300 metros en los valles interandinos 2. Quechua De 2.300 a 3.500 msnm
	Contumaza	Zona de clima semicálido, desértico, con deficiencia de lluvia en todas las estaciones, con humedad relativa calificada como húmeda			Matorral arbustivo	Selva alta, clima muy variado Las lluvias pueden superar los 3.000 milímetros anuales Clima muy variado Las lluvias pueden superar los 3.000 milímetros anuales.	Yunga De 500 a 2.300 msnm y también de 1.000 a 2.300 metros en los valles interandinos
Arequipa	Arequipa	Zona de clima semiárido, templado, con deficiencia de lluvia en otoño, invierno y primavera, con humedad relativa calificada como seca	17,1	102,3	Agricultura costera y andina	Serranía esteparia Las temperaturas medias oscilan entre 6° y 12° C.	Quechua De 2.300 a 3.500 msnm
	Castilla	1. Zona de clima semiárido, templado, con deficiencia de lluvia en otoño, invierno y primavera, con humedad relativa calificada como seca			Desierto costero	Desierto del Pacífico. Ausencia de lluvias, terreno desértico	Yunga De 500 a 2.300 msnm y también de 1.000 a 2.300 metros en los valles interandinos
Ucayali	Coronel Portillo	Zona de clima cálido, lluvioso, con lluvia abundante en todas las estaciones del año, con humedad relativa calificada como muy húmeda	26,0	1944,3	Áreas sin presencia de bosque amazónico	Selva baja Temperatura promedio anual de 24° a 26° C	Omagua Entre los 80 y los 400 msnm 80 metros en la boca del rio Yaraví
Pasco	Oxapampa	Zona de clima semicálido, lluvioso, con lluvia abundante en todas las estaciones del año, con humedad relativa calificada como muy húmeda	5,5	897,9	Bosque de montaña montano	Selva alta, clima muy variado Las lluvias pueden superar los 3.000 milímetros anuales.	Quechua De 2.300 a 3.500 msnm
Lambayeque	Lambayeque	Zona de clima desértico, cálido, con deficiencia de lluvia en todas las estaciones, con humedad relativa calificada como húmeda	22,8	35	Agricultura costera y andina	Bosque seco ecuatorial Promedio anual de 23° y 24° C Prolongada estación seca anual que puede extendersenueve meses del año	Chala De 0 a 500 msnm

Biomédica 2017;37(Supl.2):180-6
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3472

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto del tipo y del número de lavados en la eficacia de mosquiteros tratados con deltametrina de larga duración para el control de *Aedes aegypti* en Girardot, Colombia

Diana García[1], Lucas Alcalá[1], Juliana Quintero[1], Sebastián Cortés[1], Helena Brochero[2], Gabriel Carrasquilla[1]

[1] Eje de Salud Pública, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El uso de mosquiteros tratados con insecticida en fórmulas de larga duración ha demostrado resultados prometedores en el control de *Aedes aegypti.*
Objetivo. Evaluar la eficacia de mosquiteros impregnados con deltametrina en una fórmula de larga duración para el control de *A. aegypti* en Girardot, Colombia, después de tres lavados.
Materiales y métodos. Se hicieron bioensayos de eficacia de los mosquiteros contra *A. aegypti* silvestres después de utilizar los siguientes tres productos de lavado, siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud: detergente en polvo, detergente en polvo y blanqueador, y jabón de barra, todos utilizados hasta en 20 lavados.
Resultados. El tipo de producto de lavado y el número de lavados afectaron significativamente la eficacia de los mosquiteros impregnados con deltametrina. El lavado con jabón de barra presentó el mayor efecto, pues en tan solo seis lavados la mortalidad bajó a 50 % (25/50), en contraste con 66 % (33/50) de mortalidad después del lavado con detergente en polvo y de 84 % (42/50) después del lavado con detergente y blanqueador. En cuanto al número de lavados, el jabón en barra también causó una mayor reducción de la eficacia: a 68 % con solo tres lavados.
Conclusión. La eficacia de los mosquiteros impregnados con deltametrina de larga duración en el control de *A. aegypti* varió con el tipo de producto de lavado y el número de lavados, siendo el jabón en barra el que redujo su eficacia en mayor medida. Se requieren nuevos estudios para establecer la disminución en la concentración del insecticida entre lavados.

Palabras clave: *Aedes aegypti*; insecticidas; bioensayos; Organización Mundial de la Salud.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3472

Effect of the type and number of washes in the efficacy of long lasting insecticidal nets for *Aedes aegypti* control in Girardot, Colombia

Introduction: The use of long lasting insecticidal materials has shown promising results in the control of *Aedes aegypti*.
Objective: To evaluate the efficacy of long-lasting insecticidal nets (PermaNet®) for *Aedes aegypti* control after three washing treatments in the city of Girardot, Colombia.
Materials and methods: Standard bioassays were conducted with the nets following the World Health Organization protocols using wild *A. aegypti* after three washing treatments: (1) Detergent powder, (2) detergent powder and bleach, and (3) bar soap, until completing 20 washes.
Results: The type and number of wash treatments had a significant effect on net efficacy. Greater effects in the insecticide bioavailability were seen for the bar soap treatment. After six washes, mortality decreased by 50% (25/50), vs 66% (33/50) for the detergent powder and 84% (42/50) for the detergent powder and bleach treatments. Regarding the number of washes, the bar soap treatment reduced the efficacy to 68% after only three washes.

Contribución de los autores:
Lucas Alcalá y Diana García: concepción de la idea de investigación, planeación de la metodología, recolección de información en campo y análisis de resultados
Juliana Quintero: concepción de la idea de investigación y análisis de resultados
Gabriel Carrasquilla: concepción de la idea de investigación
Sebastián Cortés: análisis estadístico
Helena Brochero: revisión de las metodologías entomológicas usadas y análisis de resultados
Todos los autores contribuyeron en la escritura del manuscrito.

Conclusion: The effectiveness of long-lasting insecticidal nets (PermaNet 2.0) for *A. aegypti* control varied in relation to the treatment and number of washes. The bar soap treatment resulted in the greatest reduction of mortality. Further studies on insecticidal reductions are needed under local conditions.

Key words: *Aedes aegypti*; insecticides; bioassay; World Health Organization.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3472

Los virus del dengue, del chikungunya y del Zika se transmiten entre humanos por la picadura de mosquitos del género *Aedes* (Diptera: Culicidae), en especial, *Aedes aegypti*.

La prevención de estas enfermedades se basa en intervenciones dirigidas a romper la cadena de transmisión con la eliminación de las formas inmaduras y adultas del vector (1). Las guías nacionales de vigilancia y control contemplan la aplicación, mediante rociado espacial, de insecticidas de síntesis química como principal estrategia durante brotes y epidemias (2).

Aunque en Colombia se ha registrado la pérdida de sensibilidad a insecticidas en poblaciones naturales de *A. aegypti* (3-5), se considera que la deltametrina es muy efectiva para su control, pues solo ha generado un incremento muy leve en los niveles de resistencia de una generación a otra de algunas poblaciones (6), y su efecto residual puede alcanzar una mortalidad superior al 80 % hasta ocho semanas después de su aplicación (7). En la búsqueda de alternativas para el control del vector, recientemente se ha probado la eficacia de este piretroide contra *A. aegypti* empleando telas impregnadas con su fórmula de larga duración (8-10).

En una intervención anterior en Girardot, departamento de Cundinamarca, considerada zona hiperendémica para el dengue en Colombia, se utilizaron cortinas y tapas elaboradas con tela de mosquitero impregnada con deltametrina de larga duración para cubrir los depósitos de agua con mayor producción de formas inmaduras de *A. aegypti*, y se encontró una reducción de 71 % en el índice de pupas por persona en las zonas de estudio, así como una buena aceptación de la intervención en la comunidad (11).

Como parte de la evaluación del alcance temporal de la eficacia de esta intervención, y con el fin de hacer recomendaciones sobre el buen uso del material en la comunidad beneficiada, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del tipo de producto de lavado y el número de lavados en la eficacia de mosquiteros tratados con deltametrina de efecto prolongado para el control de poblaciones silvestres de *A. aegypti.*

Correspondencia:
Diana Carolina García, Eje de Salud Pública, Fundación Santa Fe de Bogotá, Carrera 7b N° 123- 90, tercer piso, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfonos: (571) 603 0303, extensión 5705, y (300) 203 8408
diana.garcia@fsfb.org.co

Recibido: 01/08/16; aceptado: 10/09/17

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en el área urbana del municipio de Girardot (4°18' N, 74°48' O), ubicado a 134 km de la capital del país, el cual tiene un área de 129 km^2 y una población de 106.283 habitantes (12). Su altitud promedio es de 289 msnm, la temperatura promedio anual es de 33,3 °C, la humedad anual, de 66,4 %, la precipitación, de 1.220 mm, y presenta un régimen bimodal de lluvias con temporadas secas de junio a septiembre y de diciembre a febrero, y lluviosas, de marzo a mayo y de octubre a noviembre (Camacho L, Díaz M, Valentín E. Metodología para la cuantificación y caracterización de las aguas combinadas urbanas – Caso ciudad de Girardot. XVII Seminario Nacional de Hidráulica e Hidrología, Popayán, 15 y 16 de septiembre de 2006).

El municipio aporta el 30,9 % de los casos anuales de dengue en el departamento de Cundinamarca (13), y el número de casos de dengue y chikungunya en el 2015 fue el más alto del departamento (503 y 8.905, respectivamente). En el 2016, se reportaron 291 casos de dengue y 125 de chikungunya. Con respecto al Zika, en el cuarto trimestre del 2015 se reportaron 1.936 casos, mientras que en el 2016 fueron 299, además de cinco casos de microcefalia (14). Hasta la semana 24 de 2017, se reportaron 146 casos de dengue, 13 de chikungunya y 15 de Zika (15).

Material tratado con insecticida

Se utilizaron mosquiteros impregnados con 55 mg/m^2 de una fórmula de larga duración de deltametrina (PermaNet® 2.0), elaborados en poliéster 100 % (75 a 100 deniers) y con un tamaño de ojo de malla de 2 x 2 mm, que cumplían con los criterios de seguridad para este tipo de mosquiteros (333/LN)

establecidos en el esquema de evaluación de insecticidas desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (16).

Tratamientos de lavado y pruebas de eficacia

De diez mosquiteros impregnados, se seleccionaron aleatoriamente fragmentos cuadrados de 25 x 25 cm. Los productos de lavado se definieron con base en la información proporcionada por los habitantes de Girardot sobre los tipos de lavado y los productos de lavado empleados más frecuentemente en el aseo de prendas delicadas. Se utilizaron los siguientes tres productos de lavado a mano de la tela de mosquitero, utilizando el mismo tiempo de remojo (cinco minutos) y de fregado (un minuto): 1) lavado a mano con detergente en polvo, 2) lavado a mano con detergente en polvo y blanqueador, y 3) lavado a mano con jabón en barra (cuadro 1). No se utilizó el lavado estándar recomendado por la OMS porque el objetivo del estudio se centraba en la evaluación de las formas de lavado tradicionales, bajo las condiciones reales en la localidad estudiada.

Cada producto de lavado se aplicó diez veces y se enjuagó siempre con 1,5 litros de agua. En todos los casos, las telas se secaron durante 24 horas a la sombra. El proceso se repitió hasta completar 20 lavados, es decir, el número máximo que permite conservar la actividad biológica en el material, según las recomendaciones de la OMS (17,18).

Los bioensayos se hicieron cada tercer lavado con 1.200 hembras provenientes de poblaciones silvestres de *A. aegypti*, obtenidas de formas inmaduras encontradas en las albercas de varios barrios de Girardot. Las hembras se mantuvieron en jaulas de cría hasta la emergencia de los mosquitos adultos. Además de los tres productos de lavado mencionados, se incluyeron dos controles, uno negativo, con fragmentos de 25 x 25 cm de muselina (tamaño de ojo de malla: 2 x 2 mm), y uno positivo, con material textil tratado con el insecticida sin lavar al que se expusieron mosquitos sensibles de la cepa Rockefeller, suministrada por el Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad Nacional de Colombia.

Cuadro 1. Tipos de lavado evaluados en condiciones de campo para determinar la eficacia de telas impregnadas con deltametrina de larga duración (PermaNet 2.0®) en poblaciones naturales de *Aedes aegypti*

Tipo de lavado	Características
Lavado a mano con detergente en polvo	Solución de 2 g/L de detergente en polvo de marca FAB®
Lavado a mano con detergente en polvo y blanqueador	Solución de 1,5 ml/L de blanqueador líquido comercial Clorox® y 2 g/ml de detergente en polvo FAB®
Lavado a mano con jabón de barra	0,5 g de jabón de barra marca Rey® (0,02 g/cm^2)

En todas las pruebas se utilizaron hembras de máximo tres días de emergidas que no se habían alimentado, provenientes de poblaciones naturales de Girardot, y otras de la cepa Rockefeller, la cual se emplea como referencia internacional para bioensayos de eficacia.

Cada cuadro de tela impregnada con deltametrina de larga duración se dispuso en marcos esféricos plásticos de forma similar a la utilizada en la prueba de 'balón de alambre' (*wire-ball*) (19). En cada uno de ellos, se introdujeron cinco hembras de *A. aegypti*. Cada grupo de mosquitos se expuso directamente al material textil durante tres minutos y, posteriormente, se traspasaron a vasos plásticos con tapa de tela de tul donde se les proporcionó solución de glucosa al 10 %. Transcurrida una hora, se contabilizó el número de individuos caídos o que no podían volar o posarse sobre las patas, con el propósito de medir el efecto de 'derribo' (*knockdown*), en tanto que la mortalidad se registró mediante el número de individuos que no respondían a ninguna clase de estímulo a las 24 horas de la exposición. La prueba se repitió diez veces. Se consideraban nulos los bioensayos en los que la mortalidad era superior a 20 % en el material de control negativo (muselina). Las pruebas se realizaron en condiciones controladas de campo, en un salón cubierto de la antigua sede de la unidad de enfermedades transmitidas por vectores de la Alcaldía Municipal de Girardot.

Durante los días en que se recolectó la información sobre los lavados con diferentes tipos de producto, se registró la temperatura promedio, máxima y mínima, con un termohigrómetro digital.

Análisis estadístico

Primero se hizo el análisis descriptivo de cada tipo de producto de lavado. Después de cada tercer lavado, se calculó el porcentaje de mortalidad, definido como el número de individuos muertos a las 24 horas de exposición comparado con el total de individuos expuestos (50 individuos expuestos por tipo de producto de lavado en cada evaluación, correspondiente a 10 repeticiones por lavado), y las respectivas varianzas y desviación estándar. El mismo análisis se hizo para evaluar el efecto de derribo (*knockdown*).

Con el propósito de analizar las diferencias en la mortalidad y el efecto de derribo (*knockdown*) de los tres productos de lavado, se utilizó la técnica ANOVA no paramétrica de dos vías (prueba de Friedman), dado que la distribución de las variables dependientes no cumplían el supuesto de normalidad, lo que permitió observar simultáneamente si existían diferencias en los efectos de los diferentes tipos de productos de lavado y el número de lavados en las medias de los individuos caídos y muertos.

Además, se utilizó un modelo de regresión de los datos de conteo con una distribución de Poisson y un intervalo de confianza de 95 %, para predecir el efecto de los diferentes tipos de productos para el lavado sobre la eficacia de la tela impregnada, dado que la unidad de análisis era el número de mosquitos muertos y el número de mosquitos caídos por ensayo. Con el fin de corroborar este supuesto, se hicieron pruebas de Shapiro-Wilk, cuyos resultados sugirieron que nuestros datos no provenían de una muestra aleatoria derivada de una distribución normal. El modelo de regresión se validó mediante la estimación de residuos con el método de Kernel, comparada con la distribución normal, y mediante la relación entre los valores observados y los predichos por el modelo para ambas variables. Estas pruebas permitieron confirmar que la especificación del modelo era válida (no se presentan los datos).

Se utilizaron especificaciones con polinomios de segundo grado para observar la velocidad del cambio en la eficacia de la tela impregnada, la cual se expresa como el efecto marginal que tiene un lavado adicional con cada tipo de producto de lavado (la pendiente). Al incluir elementos de segundo grado, se quiso investigar si el deterioro de la efectividad del toldillo era constante o lineal, o si, por el contrario, el patrón observado no era lineal, es decir, si cada lavado reducía la efectividad en mayor grado que el anterior. Todos los procedimientos estadísticos se hicieron con el programa Stata 13.0® (20).

Resultados

La temperatura promedio fue de 32 °C (mínima: 29 °C; máxima: 35 °C) y la humedad relativa promedio, de 50 % (mínima: 32 %; máxima: 64 %). En ninguno de los bioensayos se registró mortalidad de los mosquitos del control negativo (tela sin tratamiento con insecticida).

En el cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos con relación al efecto en *A. aegypti* del tipo de producto de lavado y el número de lavados de las

Cuadro 2. Efecto del tipo de producto de lavado y del número de lavados en *Aedes aegypti*. **A)** Promedio de individuos muertos. **B)** Promedio de individuos caídos

A) Tratamiento	Número de lavados								Total	Media	DE
	0	3	6	9	12	15	18	20			
Control positivo[a]	30...	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Control negativo[b]	0.	0.	0...	0.....	0	0	0	0	0	0.	0...
Detergente en polvo	47...	46...	33.....	17.....	17..	9	4	14	140	20,0	14,58
Detergente y blanqueador	50...	47...	42.....	25.....	14..	13	13	18	172	24,6	14,30
Jabón en barra	48...	34...	25.....	8...	8	2	13	12	102	14,6	11,10
Total	145.....	127.....	100.....	50.....	39..	24	30	44	414	19,7	13,41
Media	48,3	42,3	33,3..	16,7..	13,0	8,0	10,0	14,7		19,7	
DE	1,5	7,2	8,50	8,50	4,58	5,6	5,2	3,0		13,4	

B) Tratamiento	Número de lavados								Total	Media	DE*
	0	3	6	9	12	15	18	20			
Control positivo[a]	30	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Control negativo[b]	0	0	0	1	0	0	2	1	4	0	0...
Detergente en polvo	49	49	38	31	9	16	10	15	168	23,9	15,57
Detergente y blanqueador	50	47	46	38	32	21	18	16	218	31,1	13,06
Jabón en barra	49	37	25	13	6	2	14	15	112	16..	11,77
Total	148	133	109	82	47	39	42	46	498	26,7	14,34
Media	49,3	44,3	36,3	27,3	15,7	13	14	15,3		23,7	
DE	1,5	6,4	10,6	12,9	14,2	9,8	4	0,57		14,3	

Número de individuos evaluados en cada lavado: 50; número de individuos evaluados en cada lavado (con los tres productos de lavado): 150
[a] Material impregnado; [b] Muselina sin impregnar; DE: desviación estándar

telas impregnadas. En el control positivo, es decir, en las poblaciones sensibles, la mortalidad fue de 100 %. Antes de la aplicación de los productos de lavado, *A. aegypti* presentaba tasas de mortalidad de más de 90 % en todas las telas impregnadas (lavado 0), en tanto que, en el vigésimo lavado, el porcentaje de mortalidad total fue de 29 % (44/150). La mortalidad según el tipo de producto de lavado fue la siguiente: con detergente, 28 % (14/50); con detergente y blanqueador, 36 % (18/50), y con jabón de barra, 24 % (12/50). El efecto de derribo (*knockdown*) total fue de 31 % (46/150) y, según el tipo de producto de lavado, de 30 % (15/50) con detergente; de 32 % (16/50) con detergente y blanqueador, y de 30 % (15/50) con jabón de barra.

En el sexto lavado, la mortalidad fue de 50 % (25/50) con jabón en barra, de 66 % (33/50) con detergente en polvo, y de 84 % (42/50) con detergente y blanqueador. Así, el lavado con jabón en barra resultó en el mayor número de individuos supervivientes. Por el contrario, el lavado con detergente y blanqueador produjo porcentajes de mortalidad más altos en la mayoría de los lavados.

El efecto de derribo (*knockdown*) disminuyó al aumentar el número de lavados, pero no en las mismas proporciones que la mortalidad. Al igual que su efecto en la mortalidad, el lavado con jabón de barra tuvo mayor efecto sobre la eficacia de la tela impregnada con insecticida. En el sexto lavado, el efecto de derribo (*knockdown*) fue de 50 % (25/50) con este producto, de 92 % (46/50) con el detergente más blanqueador, y de 76 % (38/50) con el detergente en polvo.

En el noveno lavado (figura 1A), se presentó la mayor disminución del efecto de derribo (*knockdown*) en las hembras evaluadas para el lavado con jabón en barra, con solo 26 % (13/50) de individuos caídos, comparado con 62 % (31/50) para el lavado con detergente en polvo y 76 % (38/50) para el lavado con detergente en polvo y blanqueador (cuadro 2).

Los resultados del análisis de rangos mediante el ANOVA mostraron diferencias significativas en la eficacia (mortalidad) del material impregnado con deltametrina (mortalidad) según los productos de lavado utilizados y el número de lavados (Friedman=18,03; p=0,012). En cuanto al efecto de derribo (*knockdown*), las diferencias también fueron significativas (Friedman=17,08; p=0,017).

Los resultados del modelo de Poisson para predecir la mortalidad y el efecto de derribo (*knockdown*) por lavado, evidenciaron que con el detergente en polvo el número de individuos muertos por cada lavado adicional disminuyó en 10,4 % (z [6]=-2,4; p=0,016); con el detergente en polvo más blanqueador, en 8,5 % (z[6]=-2,03;p=0,043), y con el jabón en barra, en 23 % (z[6]=-4,36;p<0,001).

Este último producto de lavado tuvo, además, un efecto estadísticamente significativo en la velocidad de reducción del efecto insecticida (error estándar del estimador=0,0075; p<0,01), lo cual indica que a la tercera lavada se generó una disminución pronunciada en la mortalidad de los individuos, contrariamente a los otros dos productos, en los que la reducción fue más escalonada y la velocidad en el cambio del efecto insecticida no fue significativa (figura 1B).

Las predicciones sobre la reducción del efecto de derribo (*knockdown*) fueron similares a las encontradas para la mortalidad, aunque menores: detergente en polvo, 7,8 % (z [6]=-196; p=0,050); detergente en polvo y blanqueador, 21 % (z [6]=-1,11; p=0,268), y jabón en barra, 22,5 % (z [6]=-4,80; p<0,001). Asimismo, la velocidad del cambio en este efecto fue significativa solo para el lavado

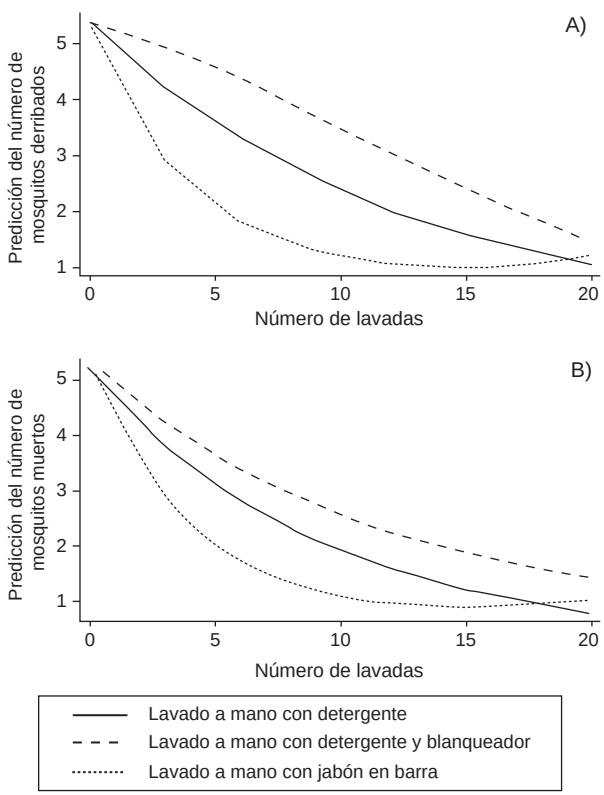


Figura 1. Predicciones de la mortalidad y del efecto de de derribo (*knockdown*) mediante el modelo de regresión de los datos de conteo con una distribución de Poisson. **A)** Efecto de derribo (*knockdown*). **B)** Mortalidad

con jabón en barra y el valor fue el mismo que el encontrado en la mortalidad (error estándar del estimador=0,0075; p<0,01) (figura 1A).

Discusión

Al igual que los resultados de otros, los del presente estudio indican que la eficacia del insecticida declinó con el número de lavados (21,22), pero se diferencian en cuanto a la proporción del efecto negativo sobre esta.

En un estudio anterior de resistencia al lavado del material impregnado con insecticidas de larga duración, se reportó una gran protección (mortalidad>80 %) después del vigésimo lavado, incluso en las pruebas con jabones comerciales (23). Los hallazgos de otro estudio, en el cual se utilizó la misma marca comercial de jabón en barra para evaluar la eficacia del material impregnado con alfacipermetrina de larga duración, contrastan con los de este, ya que el efecto de derribo (*knockdown*) se mantuvo en 100 % hasta el último lavado, en tanto que la mortalidad estuvo por encima de 97,8 % hasta el decimosegundo lavado y disminuyó a 70 % en el vigesimosegundo (24).

Sin embargo, en estos estudios se utilizaron poblaciones de *Anopheles albimanus*, ya que el principal objetivo de los productos comerciales empleados es el control de la transmisión de la malaria. Estos resultados evidencian la importancia de tener en cuenta los aspectos bioecológicos de las especies para explicar la significativa reducción en la mortalidad de *A. aegypti,* especie que al ser antropofílica y urbana tiene contacto más frecuente y en mayor cantidad con insecticidas, lo cual podría desembocar, con el tiempo, en pérdida de la sensibilidad.

Dado que se usó el mismo método de lavado y el mismo tipo de mosquitero en los lavados, se descartó la posibilidad de que el proceso de fregar la tela, o el tiempo de regeneración entre lavadas, causaran variación en la mortalidad, lo cual indica que el tipo de producto utilizado en cada lavado fue lo que ocasionó la pérdida diferencial de insecticida en las fibras de la tela. En este sentido, es necesario hacer nuevos estudios para determinar la interacción entre las moléculas y la pérdida de concentración de la deltametrina con cada producto de lavado utilizado.

Los resultados obtenidos con respecto al efecto de derribo (*knockdown*) indican que hay recuperación de los mosquitos después de una hora sin exposición al material impregnado, en especial, con el lavado con detergente en polvo y el lavado con detergente y blanqueador.

El hecho de que el lavado con detergente en polvo y blanqueador haya tenido menores efectos en la mortalidad y en el derribo (*knockdown*), contradice lo esperado si se tiene en cuenta que en las especificaciones de fábrica sobre el uso de este tipo de toldillo impregnado con insecticida de larga duración, se recomienda no usar blanqueador en su lavado (25). Según los resultados del presente estudio, precisamente ese tratamiento fue el de menor efecto negativo sobre la biodisponibilidad del insecticida, por lo menos hasta el sexto lavado, con valores de mortalidad superiores a 80 %, es decir, el valor recomendado por la OMS. No hay una explicación clara para este resultado.

Los porcentajes de mortalidad de *A. aegypti* antes del uso de los productos de lavado (>90 %) indica que las telas impregnadas con deltametrina de larga duración son eficaces para controlar las poblaciones silvestres en campo. Sin embargo, deben hacerse estudios para conocer los cambios en la sensibilidad de esta población con respecto a la variación de las concentraciones de deltametrina en Cundinamarca donde, hasta el 2009, fecha de la última evaluación de la Red de Vigilancia de la Resistencia a Insecticidas de uso en Salud Pública en Colombia, no se había reportado resistencia (26). Además, es necesario analizar el efecto en condiciones de campo de otros componentes que intervienen en la eficacia de las telas impregnadas, como la temperatura y la radiación solar directa, entre otros.

En investigaciones anteriores se ha planteado la necesidad de hacer estudios de eficacia en condiciones reales y la utilización de métodos tradicionales de lavado para determinar los más apropiados en la implementación de programas operacionales (23).

Es evidente la necesidad de continuar este tipo de estudios para vigilar la biodisponibilidad de los insecticidas en el material y su efecto en *A.aegypti*. Los resultados de este estudio son concluyentes y permiten recomendar a los usuarios de los mosquiteros impregnados que no utilicen el jabón en barra para lavarlos y que lo hagan, como máximo, seis veces para garantizar una mortalidad adecuada de *A. aegypti* (>80 %).

Agradecimientos

Los investigadores agradecen de manera especial a Jorge Urquijo, Sandra Martha Lamprea y Magnolia Lamprea, por la recolección de los mosquitos silvestres y la realización de las pruebas de eficacia.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no tenemos ningún conflicto de intereses que pudiera comprometer nuestra imparcialidad en la realización y el análisis del estudio.

Financiación

El financiamiento de este estudio se obtuvo en el marco del estudio *Ecobiosocial Research on Dengue and Chagas Disease in Latin America and the Caribbean* (fase 2) financiado por el Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Referencias

1. **Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E.** A review of on successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. Vaccine. 2014;10:1326-7. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.040
2. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue. 2011. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2014. Disponible en: http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/dengue/03%20vigilancia%20entomo%20dengue.pdf.
3. **Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W.** Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. Acta Trop. 2011;118:37-44. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007
4. **Santacoloma-Varón L, Cháves-Córdoba B, Brochero HL.** Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. Rev Panam Salud Pública. 2010;27:66-73. https://doi.org/10.1590/S1020-49892010000100010
5. **Fonseca-González I, Quiñones ML.** Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. Rev Colomb Entomol. 2005;31:107-15.
6. **Kumar S, Thomas A, Pillai MK.** Deltamethrin: Promising mosquito control agent against adult stage of *Aedes aegypti* L. Asian Pac J Trop Med. 2011;4:430-5. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60120-X
7. **Paredes-Esquivel C, Lenhart A, del Río R, Leza MM, Estrugo M, Chalco E, *et al*.** The impact of indoor residual spraying of deltamethrin on dengue vector populations in the Peruvian Amazon. Acta Trop. 2016;154:139-44. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.020
8. **Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas E, Levy M, Alexander N, *et al*.** Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in México and Venezuela: Cluster randomised trials. BMJ. 2006;332:1247-52. https://doi.org/10.1136/bmj.332.7552.1247
9. **Lenhart A, Orelus N, Maskill R, Alexander N, Streit T, McCall PJ.** Insecticide-treated bednets to control dengue vectors: Preliminary evidence from a controlled trial in Haiti. Trop Med Int Health. 2008;13:56-67. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01966.x.
10. **Quintero J, Brochero H, Manrique-Saide P, Barrera-Pérez M, Basso C, Romero S, *et al*.** Ecological , biological and social dimensions of dengue vector breeding in five urban settings of Latin America: A multi-country study. BMC Infect Dis. 2014;14:1-13. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-38
11. **Quintero J, García-Betancourt T, Cortés S, García D, Alcalá L, González-Uribe C, *et al*.** Effectiveness and feasibility of long-lasting insecticide-treated curtains and water container covers for dengue vector control in Colombia: A cluster randomised trial. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2015;109:116-25. https://doi.org/10.1093/trstmh/tru208
12. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística.** Proyecciones de población 2005-2020. Bogotá, D.C.: DANE; 2017.
13. **Padilla J, Rojas D, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá: Guías Impresión; 2012 p. 82.
14. **Siviliga.** Vigilancia rutinaria por eventos departamental. Bogotá: INS; 2015. Fecha de consulta: 7 de diciembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx.
15. **Secretaría de Salud de Cundinamarca.** Boletín epidemiológico, enfermedades transmitidas por vectores.Semana 24 de 2017. Bogotá: Secretaría de Salud de Cundinamarca; 2017.
16. **World Health Organization.**Report of the twelfth WHOPES working group meeting. Geneva: World Health Organization; 2009. p. 120.
17. **World Health Organization.** Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets. Geneva: World Health Organization; 2005.
18. **World Health Organization.** Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions. Geneva: World Health Organization; 2009.
19. **World Health Organization.** Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. Geneva: World Health Organization; 2006. p. 70.
20. **StataCorp.** Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: Stata Corp.; 2017.
21. **Gimnig JE, Lindblade KA, Mount DL, Atieli FK, Crawford S, Wolkon A, *et al*.** Laboratory wash resistance of long-lasting insecticidal nets. Trop Med Int Health. 2005;10:1022-9. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01481.x
22. **Kayedi MH, Lines JD, Haghdoost AA.** Evaluation of the wash resistance of three types of manufactured insecticidal nets in comparison to conventionally treated nets. Acta Trop. 2009;111:192-6. https://doi.org/10.1016/j.actatropica. 2009.04.002
23. **Gunasekaran K, Vaidyanathan K.** Wash resistance of Perma Nets in comparison to hand-treated nets. Acta Trop. 2008;105:154-7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.10.008
24. **Morales CA.** Evaluación de la residualidad de alfacipermetrina en toldillos de larga duración Interceptor sobre *Anopheles albimanus*, bajo condiciones regulares de uso en Buenaventura. Revista Icosan. 2010;1:6-13.
25. **Vestergaard Frandsen.** PermaNet 2.0. Washington, D.C.: Vestergaard Frandsen Inc.; 2014.
26. **Instituto Nacional de Salud.** Informe epidemiológico "Red de vigilancia de la resistencia a insecticidas de uso en salud pública en Colombia 2004-2014". Bogotá: INS; 2014.

Biomédica 2017;37(Supl.2):187-92
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3396

COMUNICACIÓN BREVE

Estimación del tiempo límite de detección del gen citocromo b de humanos en hembras de *Lutzomyia evansi*

José Gabriel Vergara, Daniel Verbel-Vergara, Ana Milena Montesino, Alveiro Pérez-Doria, Eduar Elías Bejarano

Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

Introducción. Las técnicas de biología molecular han permitido ampliar el conocimiento sobre las fuentes de ingestión de sangre de los insectos vectores. Sin embargo, la utilidad de estas técnicas depende de la cantidad de sangre ingerida y del proceso de digestión en el insecto.
Objetivo. Determinar el tiempo límite de detección del gen citocromo b (*Cyt b*) de humanos en hembras de *Lutzomyia evansi* alimentadas experimentalmente.
Materiales y métodos. Se evaluaron ocho grupos de hembras de *L. evansi* alimentadas con sangre humana, las cuales fueron sacrificadas en intervalos de 24 horas desde el momento de la ingestión sanguínea. Se extrajo el ADN total de cada hembra y se amplificó un segmento de 358 pb del gen *Cyt b*. Los productos amplificados fueron sometidos a un análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP), con el fin de descartar falsos positivos.
Resultados. El segmento del gen *Cyt b* de humanos fue detectado en 86 % (49/57) de las hembras de *L. evansi* a partir de las 0 horas y hasta 168 horas después de la ingestión de sangre. En 7 % (4/57) de los individuos se amplificó el ADN del insecto y en el 7 % restante no se amplificó la banda de interés. No se encontraron diferencias estadísticas en cuanto a la amplificación del segmento del gen *Cyt b* de humanos ni al número de muestras amplificadas entre los grupos de hembras sacrificadas a distintas horas después de la ingestión.
Conclusión. El segmento del gen *Cyt b* de humanos fue detectable en hembras de *L. evansi* hasta 168 horas después de la ingestión de sangre.

Palabras clave: Psychodidae; citocromo b; insectos vectores; leishmaniasis; sangre.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3396

Estimation of time detection limit for human cytochrome b in females of *Lutzomyia evansi*

Introduction: Molecular biology techniques have allowed a better knowledge of sources of blood meals in vector insects. However, the usefulness of these techniques depends on both the quantity of ingested blood and the digestion process in the insect.
Objective: To identify the time limit for detection of the human cytochrome b (*Cyt b*) gene in experimentally fed females of *Lutzomyia evansi*.
Materials and methods: Eight groups of *L. evansi* females were fed on human blood and sacrificed at intervals of 24 hours post-ingestion. Total DNA was extracted from each female and a segment of 358 bp of *Cyt b* was amplified. In order to eliminate false positives, amplification products were subjected to a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.
Results: The human *Cyt b* gene segment was detected in 86% (49/57) of the females of *L. evansi*, from 0 to 168 hours after blood ingestion. In 7% (4/57) of the individuals we amplified insect DNA, while in the remaining 7%, the band of interest was not amplified. We did not find any statistical differences between groups of females sacrificed at different times post-blood meal regarding the amplification of the human *Cyt b* gene segment or the number of samples amplified.
Conclusion: The human *Cyt b* gene segment was detectable in *L. evansi* females up to 168 hours after blood ingestion.

Key words: Psychodidae; cytochrome b; insect vectors; blood; leishmaniasis.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3396

Contribución de los autores:
José Gabriel Vergara: recolección de muestras, ensayos moleculares, análisis de los datos y redacción del manuscrito
Ana Milena Montesino: recolección de muestras y ensayos moleculares
Daniel Verbel-Vergara: diseño de experimentos de laboratorio y ensayos moleculares
Alveiro Pérez-Doria y Eduar Elías Bejarano: diseño de experimentos de laboratorio, análisis de los datos y corrección del manuscrito

La determinación de los vertebrados que sirven como reservorios silvestres de parásitos del género *Leishmania* spp. es importante para comprender el ciclo epidemiológico de la leishmaniasis, y suministra información para el control de la enfermedad (1).

Anteriormente, dicha determinación se hacía mediante la prueba de precipitina, un ensayo inmunológico que permitía detectar antígenos sanguíneos específicos de grupos de vertebrados a partir del contenido del tubo digestivo de flebotomíneos alimentados (2). Aunque esta técnica permitió conocer las relaciones biológicas entre algunas especies de flebotomíneos y vertebrados (3,4), la enorme diversidad biológica de los grupos taxonómicos involucrados (aves, mamíferos, reptiles y anfibios) restringía su uso por la carencia de los respectivos antisueros para cada uno de estos animales (5). Además, los procesos digestivos de los flebotomíneos provocan modificaciones en los epítopos reconocidos por los anticuerpos utilizados, lo que reduce la especificidad del ensayo serológico y el tiempo efectivo de detección del vertebrado (6).

Frente a estas limitaciones, las técnicas de biología molecular se han convertido en una herramienta de primera elección en la determinación de las fuentes de ingestión de sangre de los flebotomíneos porque amplían la gama de especies de vertebrados que se puede caracterizar.

El gen citocromo b (*Cyt b*) es el marcador molecular más empleado en la determinación de las fuentes de ingestión de sangre de los mosquitos (7,8) y los flebotomíneos (9,10). A pesar de ello, algunos investigadores se abstienen de usarlo dada la posibilidad de amplificar también parte del genoma del insecto en el proceso; en su lugar, prefieren emplear genes nucleares que, aunque presentan menor número de copias por célula, son exclusivos de grupos particulares de vertebrados, como sucede con el gen de la prepronociceptina (*PNOC*), presente únicamente en mamíferos, y cuya utilidad se ha comprobado en flebotomíneos del Viejo y el Nuevo Mundo (5,11). Sin embargo, aunque con este marcador se reduce la inespecificidad, el ADN blanco solo se puede detectar en un periodo máximo de 24 horas después de la ingestión de sangre (5,11), lo cual reduce el número de muestras aptas para determinar las fuentes de ingestión e implica la pérdida de información.

Por ello, es necesario establecer para cada especie de insecto hematófago el tiempo efectivo de detección de cada marcador molecular en la sangre ingerida, en lo cual influyen, no solo el número de copias del marcador, sino también la cantidad de sangre ingerida y las particularidades del proceso digestivo en el vector como, por ejemplo, la actividad catalítica de las enzimas que degradan el ADN (12). Se ha demostrado que la actividad de estas enzimas en los flebotomíneos es mayor entre las 24 y las 48 horas del momento de la alimentación, según la especie involucrada (13).

En este contexto, en el presente estudio se estableció el tiempo límite de detección del gen *Cyt b* de humanos en hembras de *Lutzomyia evansi*, principal vector de *Leishmania* spp. en la región Caribe colombiana.

Materiales y métodos

Se recolectaron, aproximadamente, 100 flebotomíneos con ayuda de aspiradores bucales y una trampa de luz de tipo Shannon en el municipio de Colosó (09°31'46,975"N, 75°21'06,056"O), departamento de Sucre, Colombia.

Los insectos se mantuvieron vivos en jaulas de cría con una dieta basada en una solución estéril de sacarosa (30 %), la cual se retiró 24 horas antes de la alimentación con sangre; esta se suministró a los flebotomíneos en un alimentador artificial de polipropileno cilíndrico de 11 por 3,7 cm, cubierto en la parte inferior con piel de pollo de dos días de edad. Sobre esta membrana se depositaron 2 ml de sangre humana desfibrinada y descomplementada.

Los insectos se extrajeron del dispositivo de alimentación con un aspirador bucal y allí se examinaron con la ayuda de un estereomicroscopio Led Zeiss Stemi 2000-C, con el fin de confirmar que se hubieran alimentado. Las hembras alimentadas se mantuvieron en jaulas de cría a una temperatura media de 28,5 °C y una humedad relativa de 85 % en el laboratorio del Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

Para los ensayos del tiempo efectivo de detección del gen *Cyt b*, se sacrificaron entre cuatro y diez hembras diariamente durante ocho días, en un periodo comprendido entre las 0 y las 168 horas de la ingestión de sangre (cuadro 1).

Correspondencia:
José Gabriel Vergara, Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 N° 16B-32, Sincelejo, Colombia
Teléfono: (575) 282 0830; fax: (575) 282 1240
josegabriel_vergara@yahoo.com

Recibido: 22/06/16; aceptado: 10/05/17

Cada espécimen sacrificado fue revisado bajo el estereomicroscopio, con el fin de registrar el grado de dilatación del abdomen provocado por la sangre según los estados de digestión descritos por Dolmatova, *et al.* (14).

Cada hembra se fragmentó para separar los últimos segmentos del abdomen, la cabeza y el ala, y emplearlos para la determinación taxonómica de la especie (15,16).

La extracción del ADN genómico total se hizo del tórax y los segmentos proximales del abdomen de cada hembra alimentada mediante el procedimiento de alta concentración de sales descrito por Pérez-Doria, *et al.* (17), al cual se le agregó un paso de digestión enzimática con proteinasa K (6,3 µg/µl) a 65 °C durante dos horas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con los iniciadores L14841 (5'-CCATC CAACATYTCADCATGATGAAA-3') y H15149 (5'-GCHCCTCAGAATGATATTTGKCCTCA-3'), que flanquean un segmento de 358 pb del gen *Cyt b* en vertebrados (18-21). La amplificación se hizo con la enzima ExAct Taq DNA Polymerase™ (M. Biotech), en un volumen final de 50 µl, que incluyó 10 pmoles/µl de los iniciadores, 5 µl de solución tampón de PCR con los dNTP incorporados, 5 µl de solución tampón Q Plus y 3 µl de la solución con ADN (aproximadamente10 ng de ADN).

El perfil térmico empleado fue el ya descrito por Paternina, *et al.* (10). Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa (2 %) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Cada una de las muestras se cuantificó en un espectrofotómetro Nano Drop 2000™, Thermo Scientific, para determinar la reproducibilidad del ensayo en los individuos de cada grupo de hembras después de la ingestión. La pureza de los ácidos nucleicos se estimó en el equipo mediante la relación de absorbancia a 260 y 280 nm.

Teniendo en cuenta que en estudios previos sobre las fuentes de ingestión se ha reportado la amplificación concomitante del gen *Cyt b* de insectos y el de vertebrados (10), se diseñó un ensayo de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) de este gen, para determinar la especificidad de los iniciadores empleados y descartar falsos positivos que pudieran afectar los límites de detección y la reproducibilidad del experimento.

El ensayo en la simulación computacional se hizo con secuencias de nucleótidos del gen *Cyt b* de humanos y de *L. evansi* de la región Caribe obtenidos en trabajos previos (datos de Pérez-Doria, *et al.,* aún no publicados). Con el programa Geneious 8 (22) se buscaron los sitios de corte de enzimas de restricción en la secuencia del segmento amplificado del gen *Cyt b* y se encontró que la enzima D corta el ADN de humanos pero no el de *L. evansi*. El sitio de corte de la endonucleasa DdeI (Promega) corresponde a la secuencia 5'…C↓TNA G…3', lo que en el caso del gen humano genera dos bandas de 100 y 250 pb, aproximadamente, mientras que por no poseer sitio blanco para la enzima, en *L. evansi* se mantiene una sola banda de 350 pb, aproximadamente.

La digestión de todos los productos amplificados se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 µl, en el que se depositaron 3 µl del producto de la PCR, cinco unidades de la enzima de restricción, 2 µl de solución tampón RE 10X y 0,3 µl de albúmina de suero bovino (10 µg/µl). La incubación se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega).

Con los ensayos de RFLP se depuraron los resultados iniciales obtenidos por PCR, y las muestras con los productos de la PCR de insecto se descartaron del análisis para determinar el tiempo efectivo de detección del gen *Cyt b*. Además, se evaluó la relación entre el tiempo posterior a la ingestión, agrupado en categorías de dos días, y la reproducibilidad de los resultados mediante un análisis de proporciones con la prueba de ji al cuadrado en el programa estadístico R (23).

Todos los experimentos fueron avalados por el Comité de Bioética de la Universidad de Sucre, según consta en el Acta N° 02 del 18 de octubre de 2011. La muestra de sangre humana se obtuvo previo consentimiento informado.

Resultados

Del grupo inicial de 100 flebotomíneos recolectados, solo 80 se alimentaron bajo las condiciones experimentales y, de estos, 57 hembras se identificaron como *L. evansi* (cuadro 1). Los 23 individuos restantes murieron en las jaulas de cría y, como no se pudo determinar el tiempo exacto de digestión, se excluyeron del análisis.

Durante la observación diaria de cada grupo de hembras sacrificadas, se registraron los estados de digestión descritos a continuación. Entre las 0 y las 24 horas, *L. evansi* presentó un estado de

digestión II, con el abdomen de color rojo y completamente lleno de sangre. El estado de digestión III se observó en hembras sacrificadas entre las 48 y 72 horas, durante las cuales, a pesar de que la presencia de sangre fue notoria, entre dos y tres segmentos abdominales se observaron vacíos. El estado de digestión V se registró a las 96 horas de la ingestión, momento en el que la sangre solo ocupaba tres o cuatro segmentos del abdomen. A las 120 horas, los individuos mostraron un estado de digestión VI, en el cual la sangre ocupaba dos segmentos del abdomen, mientras que las hembras sacrificadas a las 144 y a las 168 horas presentaron el estado de digestión VII, en el que no se observó sangre en el abdomen a pesar de estar distendido (figura 1).

Con la técnica de PCR se amplificó un segmento de 358 pb del gen *Cyt b* en el 93 % de las hembras analizadas (n=57) y en todos los grupos evaluados (figura 2), aunque en algunos de los individuos sacrificados a las 72, 96 y 120 horas no hubo amplificación. Mediante el análisis de especificidad con la técnica de RFLP, se determinó que en 86 % (n=49/57) de las hembras de *L. evansi* estudiadas, el segmento amplificado correspondía al gen *Cyt b* de humanos, mientras que en 7 % (n=4/57) de estas correspondía al gen *Cyt b* del insecto (cuadro 1).

Con estos valores se hizo el análisis estadístico en el cual no se encontraron diferencias entre los grupos evaluados en cuanto a la capacidad de amplificar el ADN de humanos, tal como lo indicó el análisis de proporciones (χ^2=4,41; gl=3; p=0,220), es decir, todas las comparaciones entre los grupos arrojaron valores de p mayores de 0,050, lo que permite concluir que las proporciones no fueron diferentes.

Discusión

El tiempo efectivo de detección del segmento de 358 pb del gen *Cyt b* de humanos en la sangre contenida en el tubo digestivo de hembras de *L. evansi* fue de 168 horas a partir del momento de la ingestión. Este margen de tiempo es el más alto registrado hasta la fecha para la detección del gen *Cyt b* en flebotomíneos y, también, es superior al observado con los demás marcadores moleculares usados en la determinación de las fuentes de ingestión de sangre. En trabajos previos, la detección de este gen no superó las 96 horas después de la alimentación (5,24-26). Además, en otros estudios solo se logró amplificar el gen de vertebrados en 65 % (24) y 72 % (10) de los flebotomíneos evaluados, mientras que en el presente trabajo se amplificó en 86 % de estos (n=49/57).

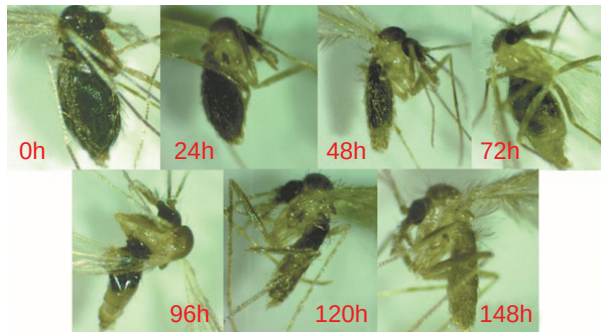


Figura 1. Progresión del proceso de digestión en hembras de *Lutzomyia evansi* alimentadas con sangre humana de manera experimental entre las 0 y las 148 horas posteriores a la ingestión de sangre

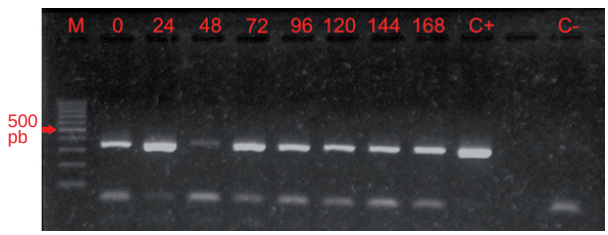


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (2 %) con los productos de la PCR del segmento del gen citocromo b detectado en hembras de *Lutzomyia evansi* alimentadas con sangre humana de manera experimental
M: marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 0 a 168: número de horas transcurridas después de la ingestión de la sangre; carril C+: control positivo; carril C-: control negativo

Al comparar los resultados obtenidos con el tiempo de detección del gen nuclear *PNOC*, que aparece como alternativa para la caracterización de la ingestión de sangre en flebotomíneos, el gen *Cyt b* ofrece un umbral de tiempo siete veces mayor, puesto que el gen *PNOC* solo es detectado hasta las 24 horas después de la ingestión (5,11). De esta manera, la ventaja que se obtiene del amplio límite de detección del gen *Cyt b* y del mayor porcentaje de muestras detectadas compensaría la amplificación inespecífica del genoma del insecto, que en trabajos previos alcanzó a registrarse en 26 % de las muestras analizadas (10), en tanto que en el presente estudio no superó el 7 % (n=4/53). Más aún, el límite de detección de 168 horas reportado en esta investigación es superior al encontrado con técnicas tradicionalmente más sensibles y costosas, como la PCR en tiempo real, con las que el mismo gen pudo detectarse como máximo hasta los cinco días después de la ingestión (27).

Probablemente, el amplio rango de detección del gen *Cyt b* observado en este trabajo se debe, en parte, al gran número de copias presentes en la

Cuadro 1. Progresión de la detección de un segmento del gen citocromo b de vertebrados en hembras de *Lutzomyia evansi* alimentadas experimentalmente con sangre humana

Número de horas después de la ingestión de sangre	0		24		48		72		96		120		144		168	
Número de hembras analizadas	10		10		9		8		8		4		4		4	
Pureza de los ácidos nucleicos	1,5		1,7		1,4		1,6		1,6		1,8		1,8		2,0	
Amplificación del gen citocromo b	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
	10	0	10	0	9	0	6	2	7	1	3	1	4	0	4	0
Productos amplificados	CH	CL	CH	CL	CH	CL	CH	CL	CH	CL	CH	CL	CH	CL	CH	CL
	10	0	9	1	8	1	5	1	7	0	2	1	4	0	4	0

P: número de individuos en los que se amplificó la banda de 358 pb del gen citocromo b; N: número de individuos en los que no se amplificó la banda de 358 pb del gen citocromo b; CH: gen citocromo b humano; CL: gen citocromo b de *L. evansi.*

célula, que puede alcanzar los 200 (28), así como al tamaño de 358 pb de la región amplificada, la cual es lo suficientemente corta para escapar a los daños producidos en el ADN durante el proceso de digestión de las enzimas presentes en el intestino del insecto, y a que el gen posee un número suficiente de sitios polimorfos que permiten la identificación genética de la especie. Tampoco se puede descartar el potencial efecto de la solución tampón Q Plus usada en la amplificación, la cual mantiene la linealidad de la cadena de ADN.

Las características descritas hacen del gen *Cyt b* un marcador idóneo para la búsqueda de fuentes de ingestión de sangre, especialmente porque permitiría a los investigadores recuperar un mayor número de muestras para el análisis y, así, obtener un mejor conocimiento de los animales que intervienen en el ciclo eco-epidemiológico de la leishmaniasis. Teniendo en cuenta que el ciclo de *Leishmania* es complejo y que frecuentemente involucra diferentes reservorios y vectores en un mismo foco, el análisis cuantitativo de las especies de vectores y de sus preferencias alimenticias contribuye a entender mejor la dinámica de transmisión en dichos focos. Este conocimiento es relevante para el establecimiento de medidas de control de la leishmaniasis, al igual que de otras enfermedades asociadas a insectos hematófagos.

En conclusión, la amplificación del gen *Cyt b* es una herramienta útil para determinar las fuentes de ingestión de sangre en especímenes del género *Lutzomyia* recolectados en campo, donde se desconoce el tiempo exacto transcurrido desde la alimentación. En este trabajo se detectó ADN humano en la sangre ingerida por los insectos hasta 168 horas después de haberse alimentado, lo cual permitió caracterizar un mayor porcentaje de muestras en comparación con estudios previos. Esto indica que el gen se puede amplificar en cualquier punto del proceso de digestión de la sangre, incluso en insectos en los que no se observan restos de ella. Por último, desde una perspectiva de costo-beneficio, la metodología aquí descrita es una técnica de fácil acceso.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tienen ningún conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación “Estudio ecoepidemiológico de vectores de *Leishmania* spp. asociados a la aparición de casos autóctonos de leishmaniasis cutánea en núcleos urbanos de la costa Caribe colombiana”, financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias (código 112954531473). Daniel Verbel-Vergara recibió una beca-pasantía del programa de formación de jóvenes investigadores e innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda”, de Colciencias, 2012.

Referencias

1. **Ashford RW.** Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol. 1996;14:523-32. https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7
2. **Tempelis CH.** Host-feeding patterns of mosquitoes, with review of advances in analysis of blood meals by serology. J Med Entomol. 1975;11:635-53 https://doi.org/10.1093/jmedent/11.6.635
3. **Morrison AC, Ferro C, Tesh RB.** Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1993;49:68-75. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.68
4. **Nery LC, Lorosa NE, Franco AM**. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:571-4. https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600006
5. **Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C.** Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:1054-9.

6. **Marassa AM, Consales CA, Galati EA.** Enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method standardization, for identification of *Lutzomyia* (Lutzomyia) *longipalpis* bloodmeals (Lutz & Neiva, 1912). Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37:441-6. https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000600003

7. **Gebresilassie A, Abbasi I, Aklilu E, Yared S, Kirstein OD, Moncaz A, *et al*.** Host-feeding preference of *Phlebotomus orientalis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in northern Ethiopia. Parasit Vectors. 2015;8:270. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0883-5

8. **Omondi D, Masiga DK, Ajamma YU, Fielding BC, Njoroge L, Villinger J.** Unraveling host-vector-arbovirus interactions by two-gene high resolution melting mosquito bloodmeal analysis in a Kenyan wildlife-livestock interface. PLoS One. 2015;10:e0134375. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134375

9. **Osorio HC, Ze-Ze L, Amaro F, Nunes A, Alves MJ.** Sympatric occurrence of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) biotypes pipiens, molestus and their hybrids in Portugal, Western Europe: Feeding patterns and habitat determinants. Med Vet Entomol. 2014;28:103-9. https://doi.org/10.1111/mve.12020

10. **Paternina LE, Verbel-Vergara D, Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Paternina-Gómez M, Martínez L, *et al*.** Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. Acta Trop. 2016;153:86-92. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.005

11. **Baum M, de Castro EA, Pinto MC, Goulart TM, Baura W, Klisiowicz Ddo R, *et al*.** Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. Acta Trop. 2015;143:8-12. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.006

12. **Kirstein F, Gray JS.** A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. Appl Environ Microbiol. 1996;62:4060-5.

13. **Dillon RJ, Lane RP.** Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. Med Vet Entomol. 1993;7:225-32. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1993.tb00681.x

14. **Dolmatova AV, Demina NA.** Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. Paris: Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-mer; 1971. p. 168.

15. **Young DG, Duran MA.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst. 1994;54:1-881.

16. **Galati EA.** Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Classificação morfologia e terminologia e identificação de adultos. En: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2003. p. 367.

17. **Pérez-Doria A, Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID.** Molecular evidence confirms the taxonomic separation of *Lutzomyia tihuiliensis* from *Lutzomyia pia* (Diptera: Psychodidae) and the usefulness of pleural pigmentation patterns in species identification. J Med Entomol. 2008;45:653-9 https://doi.org/10.1093/jmedent/45.4.653

18. **Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, *et al*.** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:6196-200

19. **Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H, Yaaghoobi F, Mohtarami F, Noorjah N.** Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. Exp Parasitol. 2006;112:232-6 https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.11.008

20. **Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH.** PCR-RFLP analysis: A promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Parasitol Res. 2005;97:247-54. https://doi.org/10.1007/s00436-005-1410-y

21. **Svobodova M, Alten B, Zidkova L, Dvorak V, Hlavackova J, Myskova J, *et al*.** Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. Int J Parasitol. 2009;39:251-6 https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.016

22. **Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, *et al*.** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012;28:1647-9. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199

23. **RCoreTeam.** R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2015.

24. **Abbasi I, Cunio R, Warburg A.** Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome B PCR and reverse line blotting. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009;9:79-86. https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0064

25. **Garlapati RB, Abbasi I, Warburg A, Poche D, Poche R.** Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. J Med Entomol. 2012;49:515-21. https://doi.org/10.1603/ME11115

26. **Sant'Anna MR, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Cavalcante RR, *et al*.** Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. Acta Trop. 2008;107:230-7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003

27. **Sales KG, Costa PL, de Morais RC, Otranto D, Brandao-Filho SP, Cavalcanti MP, *et al*.** Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. Parasit Vectors. 2015;8:230. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-3

28. **Wallace DC.** Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:8739-46.

Biomédica 2017;37(Supl.2):193-200
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3584

COMUNICACIÓN BREVE

Detección del virus del dengue en larvas y pupas de *Aedes aegypti* recolectadas en áreas rurales del municipio de Anapoima, Cundinamarca, Colombia

Myriam Lucía Velandia-Romero[1], Víctor Alberto Olano[2], Carolina Coronel-Ruiz[1], Laura Cabezas[2], María Angélica Calderón-Peláez[1], Jaime Eduardo Castellanos[1], María Inés Matiz[2]

[1] Grupo de Virología, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Instituto de Salud de Ambiente, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La incidencia y la prevalencia del dengue en Cundinamarca son elevadas y, recientemente, se detectó *Aedes aegypti* en algunas áreas rurales del departamento.
Objetivo. Evaluar la transmisión transovárica del virus del dengue en larvas y pupas recolectadas en áreas rurales del municipio de Anapoima.
Materiales y métodos. Se recolectaron ejemplares vivos en 53 viviendas y se transportaron al laboratorio de Anapoima, donde se clasificaron, se agruparon y se congelaron. Llevadas a Bogotá, se las homogeneizó, se les extrajo el ARN con Trizol®, se las sometió a una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (*Reverse Transcription Polymerase change reaction*, RT-PCR) y a PCR convencional, y los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 2 %.
Resultados. En 54,7 % de las viviendas evaluadas se encontraron formas inmaduras del vector y el serotipo más frecuente fue el DENV-1. Sin embargo, en algunos *pools* se detectó la presencia simultánea de los serotipos DENV 1 y 2, DENV 1 y 3, y DENV 1 y 4, así como los serotipos DENV 1, 2 y 3.
Conclusión. Los resultados confirmaron la transmisión vertical del virus de manera natural en el área rural del municipio, lo cual reafirma la capacidad vectorial de *A. aegypti* y explica, en parte, la persistencia del virus en la región y la posibilidad de que en la fase adulta el vector lo transmita sin haber consumido sangre infectada. Esta situación aumenta el riesgo de infección por el virus del dengue en Colombia y, por lo tanto, la necesidad de adelantar programas de prevención y control en todas las zonas con presencia del mosquito.

Palabras clave: *Aedes*, virus del dengue, área rural, Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3584

Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia

Introduction: There is a high incidence and prevalence of dengue in the department of Cundinamarca, and recently *Aedes aegypti*, the main vector of dengue virus (DENV), was detected in some of its rural areas.
Objective: To evaluate viral transovarial transmission in larvae and pupae collected in rural areas of the municipality of Anapoima, Cundinamarca.
Materials and methods: Live larvae and pupae were collected from 53 homes and later they were taken to the laboratory in Anapoima, where they were classified, pooled and frozen. In Bogotá, they were homogenized, RNA was extracted with Trizol™, and RT-PCR and conventional PCR were performed. The amplified products were analyzed on 2% agarose gels.
Results: In 54.7% of the houses we found *A. aegypti* in immature stages, and DENV-1 was the most frequent serotype. However, the simultaneous presence of DENV 1 and 2, DENV 1 and 3, DENV 1 and 4, and DENV 1, 2 and 3 serotypes was detected in some pools.

Contribución de los autores:
Myriam Lucía Velandia-Romero: concepción de la idea, extracción del ARN de las muestras, análisis de resultados y escritura del manuscrito
Víctor Alberto Olano: concepción de la idea, recolección y determinación taxonómica de los ejemplares, análisis de resultados y escritura del manuscrito
Carolina Coronel-Ruiz: desarrollo del proyecto y análisis estadístico de los datos
Laura Cabezas: georreferenciación de las viviendas, recolección de información y desarrollo de la base de datos
María Angélica Calderón-Peláez: procesamiento de las muestras mediante RT-PCR
Jaime Eduardo Castellanos: análisis de resultados, escritura y revisión crítica del manuscrito
María Inés Matiz: concepción de la idea, análisis de resultados, escritura y revisión crítica del manuscrito

Conclusion: The results confirmed the natural vertical transmission of the virus in the rural area under study. These findings confirmed the vector capacity of *A. aegypti,* and partly explains the persistence of the virus in the region and the possibility of transmission by the vector during adulthood without having ingested infected blood. This situation increases the risk of DENV infection in Colombia and the need for prevention and control programs in all areas where the mosquito is present.

Key words: *Aedes*; dengue virus, rural areas, Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3584

El ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L) comprende las fases de huevo, larva, pupa y adulto (1). En condiciones de laboratorio, luego de consumir sangre humana las hembras depositan entre 100 y 300 huevos de 0,8 mm sobre las paredes de los recipientes y en contacto con el agua. Pasados dos o tres días, y según las condiciones de humedad y temperatura, los huevos eclosionan; las larvas son exclusivamente acuáticas, muy activas y consumen para su desarrollo la materia orgánica presente en el recipiente, incluso, llegan a practicar el canibalismo, pues pueden alimentarse de otras larvas de su especie o de otras especies (2). Entre los 7 y los 14 días en condiciones óptimas de temperatura (25 a 29 °C) y alimentación, las larvas se transforman en pupas. En este estado permanecen entre uno y tres días, y experimentan cambios anatómicos y fisiológicos, no se alimentan y apenas se mueven hasta el momento en que emergen. Los adultos son alados y dimorfos; 24 horas después de su emergencia están en capacidad de aparearse y pueden vivir entre 35 y 40 días (3).

La importancia epidemiológica de *A. aegypti* radica en que este mosquito es el principal vector, no solo de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), sino también de los virus de la fiebre amarilla (YFV), del chikungunya (CHIKV), del Zika (ZIKV) y de otros virus (4).

En Colombia, *A. aegypti* circula en todos los departamentos y se lo considera como el principal vector del virus del dengue en áreas urbanas por debajo de los 1.800 msnm (5). Sin embargo, en Málaga, departamento de Santander, se lo ha encontrado a 2.200 msnm (6) y, recientemente, a 2.302 msnm en el municipio de Bello, Antioquia (7).

Correspondencia:
Myriam Lucía Velandia-Romero, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Avenida Carrera 9 N° 131 A-02, edificio D, segundo piso, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 648 9066; fax: (571) 648 9066
velandiamyriam@unbosque.edu.co y mlvelandiaro@gmail.com

Recibido: 16/08/16; aceptado: 18/05/17

Las condiciones socioeconómicas, así como las migraciones y el desplazamiento en el país, han aumentado los asentamientos humanos en zonas sin condiciones apropiadas de saneamiento básico. Estas situaciones han permitido que *A. aegypti* colonice más áreas del territorio, incluidas las zonas rurales (8,9).

Recientemente, Olano, *et al.* (8), y Pérez-Castro, *et al.* (10), confirmaron la presencia del mosquito y la circulación de los cuatro serotipos del virus del dengue en las áreas rurales de los municipios de La Mesa y Anapoima, Cundinamarca,

En estos municipios, la circulación del virus es muy alta en las zonas urbanas, lo cual puede deberse a la presencia de infecciones asintomáticas por dengue, a fallas en las campañas de prevención y control del vector en dichas zonas, y a la poca atención que se presta al dengue y al mosquito vector en las áreas rurales. Otra explicación de la persistencia del virus es la posibilidad de otras formas de transmisión y circulación del virus en el vector, por ejemplo, la transmisión transovárica o vertical (11,12).

En este contexto, en el presente trabajo se evaluó la transmisión vertical del DENV en larvas y pupas de *A. aegypti* capturadas en zonas rurales (cuatro veredas y dos inspecciones de policía) del municipio de Anapoima, Cundinamarca.

Materiales y métodos

Área de estudio

El municipio de Anapoima pertenece a la región del Tequendama, en el suroccidente del departamento de Cundinamarca, a 87 km de Bogotá, sobre la carretera que conduce a Girardot, vía La Mesa (figura 1). El municipio tiene una altitud promedio de 710 msnm, temperatura promedio de 26 ºC y precipitación anual promedio de 1.300 msnm; su extensión es de 124,2 km^2, su relieve es montañoso, y posee una población de 13.312 habitantes, de los cuales 45 % vive en el área rural, según los registros del DANE para 2015. La economía del municipio se basa en la agricultura (árboles frutales, café, caña de azúcar) y en el turismo, principal renglón de su economía.

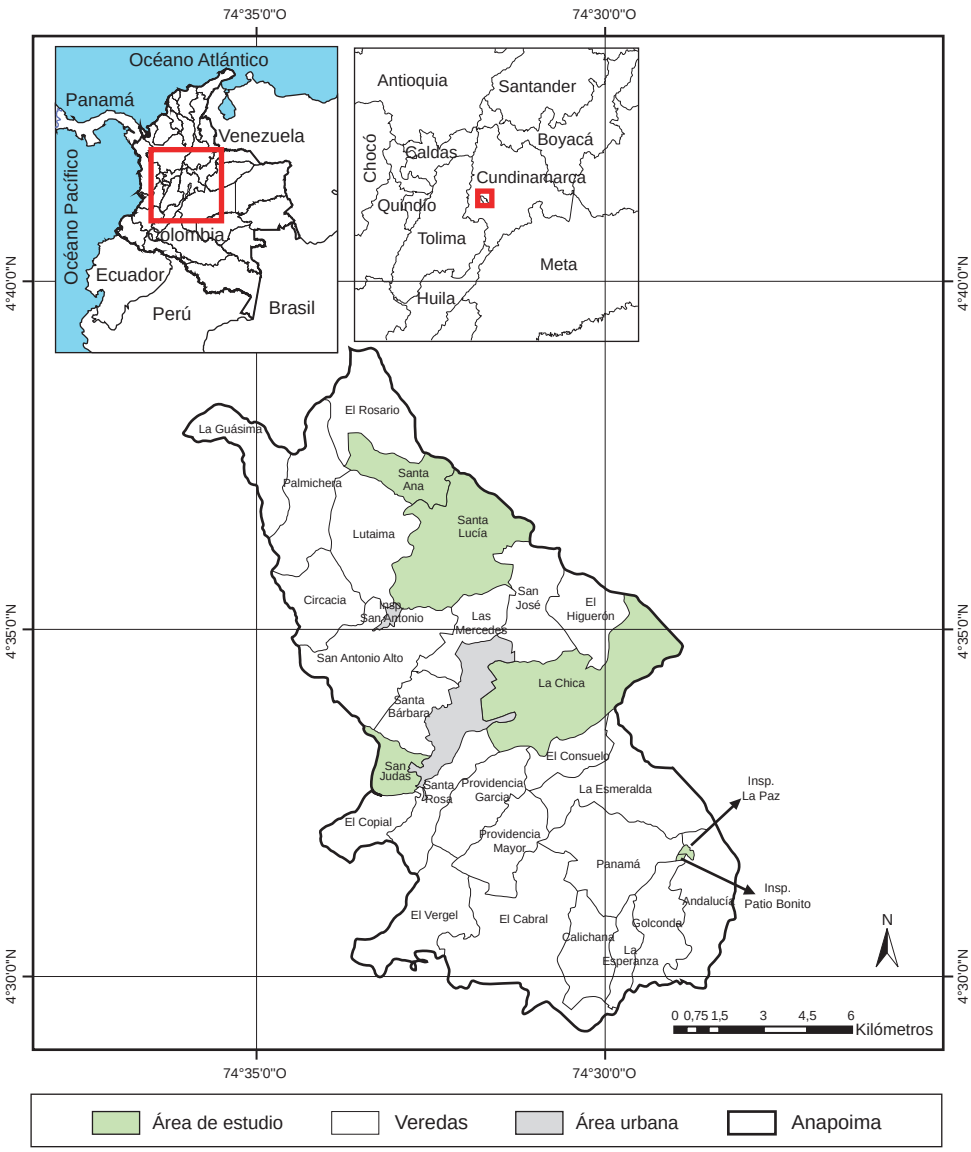


Figura 1. Área de estudio del municipio de Anapoima, departamento de Cundinamarca, Colombia. Se muestran las veredas e inspecciones de policía visitadas

Entre mayo y junio de 2016, se visitaron las veredas (subdivisión territorial de áreas rurales con una población de 50 a 1.200 habitantes) de La Chica, Santa Ana, Santa Lucía, y San Judas, y las inspecciones de policía (subdivisión territorial de áreas rurales regida por un inspector de policía) de Patio Bonito y La Paz (figura 1).

Recolección de larvas y pupas

Se inspeccionaron los principales criaderos potenciales de *A. aegypti* (albercas y tanques utilizados para almacenar agua de consumo) (13,14). Los ejemplares recolectados se almacenaron vivos en tubos de ensayo y se colocaron en gradillas dentro de una nevera de poliestireno expandido (icopor) para ser transportados al laboratorio ubicado en el municipio de Anapoima (Fundación Lazos del Calandaima). Allí se identificaron en el estereomicroscopio los individuos (larvas y pupas) hasta el nivel de especie, de acuerdo con sus características morfológicas (15,16), se almacenaron en grupos de 30 individuos por vial y se congelaron a -20 °C.

Extracción y amplificación del ARN viral

Las larvas o pupas se transportaron a Bogotá en hielo seco y, una vez en el laboratorio, se verificaron los códigos y el estado de las muestras, e inmediatamente se almacenaron a -80 °C. Posteriormente,

cada grupo (*pool*) fue homogeneizado en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) y centrifugado a 12.000*g* durante 10 minutos y a 4 °C; luego se tomaron los sobrenadantes y se les agregó Trizol® siguiendo las instrucciones del fabricante.

La presencia de ARN viral se evaluó según el protocolo de la PCR anidada de Chien, *et al.* (17). Inicialmente, se hizo una RT-PCR para la detección del virus del dengue utilizando 400 ng de ARN y el estuche SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System®, con los siguientes iniciadores: MD1: -5´TCAATATGCTGAAACGCGC GAGAAACCG3´y D2: -5´TTGCACCAACAGTCAA TGTCTTCAGGTTC3´-.

El programa de amplificación fue el siguiente: transcripción inversa a 50 °C durante 15 minutos, desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos y a 94 °C durante 2 minutos. La amplificación se hizo en 30 ciclos con las siguientes temperaturas: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 30 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

La presencia del ARN viral se observó en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio y un producto de amplificación de 511 pb. Si la muestra era positiva, se hacía una segunda ronda de PCR para la tipificación en suero de los virus utilizando el mismo estuche de PCR; como cebadores, se emplearon el iniciador D1, y los siguientes iniciadores específicos para cada serotipo:

DENV-1: TS1 -5´CGTCTCCGTGATCCGGGGG3´-

DENV-2: TS2 -5´CGCCACAAGGGCCATGAACAG3´-

DENV-3: TS3 -5´TAACATCATCATGACACAGAGC3´-

DENV-4: TS4 -5´CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA3´-.

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización a 94 °C durante dos minutos. Para la amplificación, se utilizaron 25 ciclos con las siguientes temperaturas: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; anillamiento a 60 °C durante 30 segundos; una extensión a 72 °C durante 30 segundos y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

Por último, se analizaron los productos de la PCR en gel de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio, y se detectaron los cuatro serotipos con un producto de 208 pb para DENV-1, de 119 pb para DENV-2, de 288 pb para DENV-3 y de 260 pb para DENV-4; como control, se evaluó la expresión del gen celular actina 1 de 683 pb, según el protocolo de Staley, *et al.* (18).

Determinación de los índices de infestación de las viviendas en las áreas evaluadas y análisis de datos

Se determinaron los índices de infestación de las viviendas inspeccionadas en las veredas e inspecciones de policía (porcentaje de viviendas positivas para formas inmaduras de *A. aegypti*). Además, se calcularon las frecuencias de infección (presencia o ausencia de ARN viral en alguna de las formas inmaduras) con base en el número de viviendas visitadas. La información obtenida en la encuesta entomológica, los datos del hallazgo del vector en las viviendas y los resultados de las pruebas de laboratorio, se tabularon con Microsoft Excel y se analizaron con el programa Stata 12.1. Posteriormente, se calcularon las frecuencias de muestras positivas, y se analizó la asociación de las variables cualitativas mediante la prueba de ji al cuadrado y el test exacto de Fischer, considerando un valor de p de 0,05 como estadísticamente significativo.

Resultados

El rango altitudinal de las viviendas visitadas estuvo entre los 538 y los 1.713 msnm. Se detectaron formas inmaduras de *A. aegypti* en 54,7 % de las viviendas visitadas en las veredas e inspecciones de policía (cuadro 1). En 64,7 % de las viviendas se detectaron pupas, en 21,4 %, larvas, y en 13,9 %, larvas y pupas. Los lugares en donde más frecuentemente se encontraron las formas inmaduras del vector fueron las albercas y los tanques para el almacenamiento de agua para consumo humano.

A pesar de que el vector se encontró en la vereda La Chica, no se detectó ARN viral en los especímenes, en tanto que en el resto de las zonas evaluadas se encontró ARN viral en larvas o en pupas (figura 2). En las veredas San Judas y Santa Ana, se encontraron formas del dengue positivas para los serotipos DENV-1 y DENV-2 en 50 % de las muestras para ambos casos. En Santa Lucía, además del DENV-1, se detectaron los serotipos DENV-3 y DENV-4 en 16,7 y 50 % de las muestras analizadas, respectivamente. En la inspección de policía de Patio Bonito, se detectaron los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3 de forma simultánea en 50 % de las viviendas visitadas, mientras que en la inspección de La Paz solo se detectó el serotipo DENV-1 (cuadro 2 y figura 3).

Cuadro 1. Veredas e inspecciones de policía del municipio de Anapoima en donde se encontraron formas inmaduras de *Aedes aegypti*

Áreas		Viviendas inspeccionadas	Viviendas con formas positivas para el vector	Índice de infestación de viviendas (%)	p
Veredas	Santa Ana	7	7	100	0,019*
	Santa Lucía	12	8	66,7	
	San Judas	2	2	100	
	La Chica	6	3	50	
Inspecciones de policía	La Paz	13	5	38,5	
	Patio Bonito	13	4	30,8	
Total		53	29	54,7**	

*: diferencias calculadas mediante prueba exacta de Fisher; **: porcentaje de todas las viviendas positivas para el vector

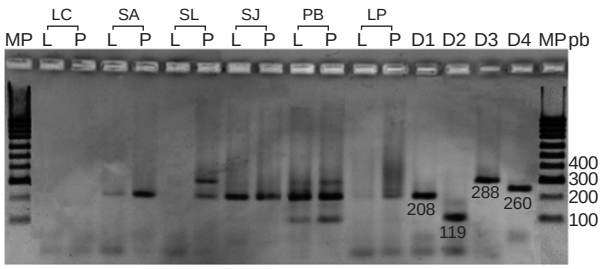


Figura 2. Gel de agarosa al 2 % en el que se visualizan los productos amplificados en PCR de segunda ronda (serotipificación) usando ARN aislado a partir de grupos de 30 individuos de larva (L) o pupa (P) recolectados en algunas viviendas. Se observa que algunos grupos fueron positivos para uno o varios serotipos del virus del dengue. Marcador de peso (MP): GeneRuler100 bp DNA Ladder™ (Thermo Fisher Scientific). DENV-1 (D1): 208 pb, DENV-2 (D2): 119 pb, DENV-3 (D3): 288 pb y DENV-4 (D4): 260 pb

Según estos resultados, el porcentaje de infección de las formas inmaduras de *A. aegypti* recolectadas en las áreas evaluadas del municipio fue de 50 %.

No se pudo establecer la asociación entre la presencia de formas inmaduras del vector y la cercanía de cada área al casco urbano, debido a la diferencia en el número de casas visitadas en cada una de ellas. Sin embargo, cuando se comparó la presencia del vector entre veredas e inspecciones de policía, se encontró que el número de viviendas con el vector en las veredas fue mayor que en las inspecciones de policía y que dicha diferencia fue estadísticamente significativa (p<0,004). Asimismo, no se observaron diferencias cuando se analizó la la presencia del DENV según la ubicación de las áreas de estudio (p=0,456).

Discusión

En el presente estudio se reporta la transmisión vertical del DENV en larvas y pupas de *A. aegypti* capturadas en áreas rurales de Cundinamarca, Colombia. Además, se confirmaron los altos índices de infestación del vector en esta zona.

La transmisión transovárica o vertical del DENV fue reportada inicialmente en modelos de infección experimental, inoculando hembras de *A. aegypti* con sangre infectada o con aislamientos virales (19). En 1983, Khin, *et al.,* recolectaron en campo larvas y mosquitos machos, y reportaron que estos individuos eran positivos para DENV-2 (20). Así, se confirmó la competencia de *A. aegypti* como vector al permitir la producción de grandes cantidades de virus y su circulación en los diferentes tejidos y órganos del insecto, incluido el aparato reproductor, lo cual favorece la transmisión vertical del virus a su progenie. Otros autores han sugerido que la presencia del virus en los estadios inmaduros del vector puede deberse al canibalismo indiscriminado que practican las larvas (19); sin embargo, esto es poco probable dada la degradación del virus por la acción de las enzimas y los ácidos digestivos. Por el contrario, el mecanismo de transmisión vertical garantiza la persistencia de los virus que se transmiten en los periodos entre epidemias o en condiciones ambientales difíciles, y convierte las formas inmaduras de *A. aegypti* en reservorios virales (21).

En este estudio se encontró que en 54,7 % de las viviendas inspeccionadas había formas de *A. aegypti*, ya que se pudieron recolectar entre uno y tres grupos de larvas, pupas o de ambas, en tanto que no se detectó *Aedes albopictus*. Este resultado es muy interesante, puesto que comúnmente este mosquito se encuentra en zonas rurales o con abundante vegetación (22,23). Aunque en Colombia *A. albopictus* fue reportado por primera vez en Leticia en 1998, hasta la fecha no se ha reportado su presencia en el departamento de Cundinamarca, lo cual sugiere que *A. aegypti* es el principal vector del DENV y, quizá, de otros arbovirus como el CHIKV y el ZIKV, en las zonas rurales visitadas, independientemente de su dispersión en el territorio (el caso de las veredas), o su concentración en una zona particular (inspecciones de policía) (24), y cerca o lejos del casco urbano.

Cuadro 2. Número de viviendas evaluadas por vereda o inspección de policía con formas del vector positivas para alguno de los serotipos del DENV

Áreas	Viviendas		Serotipos (%)	p
	Procesadas	Con formas positivas para DENV n (%)		
Veredas				
Santa Ana	7	2 (28,6)	DENV-1 (50,0) DENV-1-DENV-2 (50,0)	0,102*
Santa Lucía	8	6 (75,0)	DENV-1 (33,3) DENV-1, DENV-3 (16,7) DENV-1, DENV-4 (50,0)	
San Judas	2	1 (50,0)	DENV-1, DENV-2 (50,0)	
La Chica	3	0 (0)	-	
Inspecciones de policía				
La Paz	4	3 (75,0)	DENV-1 (100)	1,000*
Patio Bonito	4	2 (50,0)	DENV-1 (50,0) DENV-1, DENV-2, DENV-3 (50,0)	

*Diferencias calculadas mediante la prueba exacta de Fisher

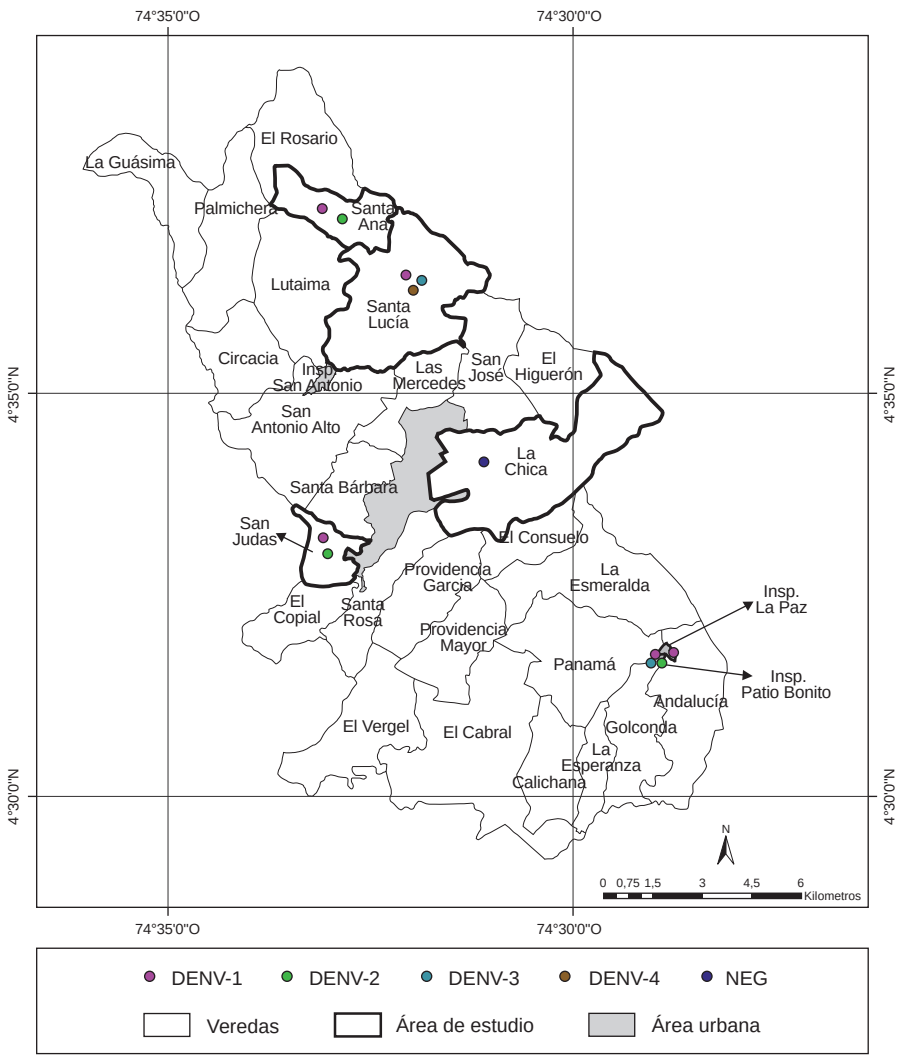


Figura 3. Área de estudio del municipio de Anapoima, departamento de Cundinamarca, Colombia. Se muestran las áreas rurales evaluadas en donde se encontraron formas inmaduras de *Aedes aegypti* positivas para alguno de los cuatro serotipos del DENV

Las visitas a las veredas y las inspecciones se hicieron entre el 2012 y el 2013, y en todas se encontró el vector. Además, se reportó la circulación de los cuatro serotipos del virus en la zona (10). Se confirmó, además, que el DENV-1 fue el serotipo más prevalente, aunque en algunas viviendas se registraron grupos positivos para dos o más serotipos. Esto último podría explicarse por la estrategia metodológica de agrupar hasta 30 individuos (larvas o pupas) por tubo, los cuales podían provenir de distintas hembras; tampoco debe descartarse la posibilidad de que una hembra depositara huevos infectados con varios serotipos, como lo reportaron previamente Bara, *et al*. (25). De todas maneras, los hallazgos de este estudio confirmaron la circulación simultánea de los cuatro serotipos del DENV en la región, lo cual aumenta la probabilidad de infecciones y reinfecciones entre los habitantes de la zona y el riesgo de que desarrollen cuadros de dengue grave.

El municipio de estudio presenta altas tasas de incidencia y seroprevalencia del DENV, al igual que otras zonas de Cundinamarca (comunicación personal, Jaime Castellanos), lo cual se explicaría, en parte, por los altos índices de infestación del mosquito, por el alto porcentaje de infección de las formas inmaduras y su consumo de sangre de personas infectadas y asintomáticas. Joshi, *et al*., reportaron que la infección del mosquito por transmisión vertical en áreas urbanas no supera el 20 % (26) y, en este caso, el porcentaje de infección fue de 50 %. La diferencia en los porcentajes puede deberse, ante todo, a las campañas de control del vector, dado que en las zonas urbanas estos programas están dirigidos a controlar la población del mosquito en los diferentes estadios de desarrollo, mientras que en las áreas rurales –por lo menos en Colombia–, no se han implementado campañas de control poblacional de *A. aegypti* y el mosquito cuenta, por lo tanto, con una gran diversidad de criaderos. Queda por determinar y evaluar el papel de los asintomáticos en la infección y la circulación del virus en áreas rurales, pues dicha posibilidad se ha planteado como la causa más importante de la existencia y la persistencia del virus (18).

Por último, los resultados obtenidos en el presente estudio confirman los altos índices de infestación de *A. aegypti* en el área rural del municipio de Anapoima y su capacidad de transmitir de manera natural el DENV. Estos hallazgos reafirman la capacidad vectorial de *A. aegypti,* lo que explica, en parte, la persistencia del virus en la región y su transmisión por el mosquito adulto sin que haya consumido sangre infectada, lo cual aumenta las áreas de influencia del DENV en el departamento.

Por lo tanto, se sugiere extender a las áreas rurales de los municipios considerados en riesgo la vigilancia de *A. aegypti,* e integrarla a los programas regulares de vigilancia entomológica del vector, así como complementarla con la vigilancia por laboratorio clínico para la determinación y confirmación de casos en estas comunidades (27).

Agradecimientos

A Humberto Mosquera y Nancy Herrera por su apoyo en la recolección del material entomológico y su determinación taxonómica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses que pudieran afectar el presente estudio.

Financiación

Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque, PCI 98-2014, y Fundación Lazos de Calandaima. Las organizaciones de financiación no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, el análisis de datos, la decisión de publicar ni en la preparación del manuscrito.

Referencias

1. **Christopher R.** *Aedes aegypti* (L.). The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. New York: Cambridge University Press; 1960. p. 739.
2. **Manrique P, Che-Mendoza A, Rizzo N, Arana B, Pilger D, Lenhart A, *et al*.** Operational guide for assessing the productivity of *Aedes aegypti* breeding sites Geneva: World Health Organization; 2011. https://doi.org/10.2471/TDR.10.978-924-1500371
3. **Icaza J.** El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. México: Bayer de México; 2003. p. 152.
4. **Tilak R, Ray S, Tilak V, Mukherji S.** Dengue, chikungunya… and the missing entity-Zika fever: A new emerging threat. Med J Armed Forces India. 2016;72:157-63. https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2016.02.017
5. **Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá: Guías de Impresión Ltda.; 2012. p. 1-17.
6. **Suárez N.** Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. Biomédica 1981;1:225. https://doi.org/10.7705/biomedica.v1i4.1809
7. **Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, *et al*.** Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. Biomédica. 2016;36:303-8. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301

8. **Olano V, Matiz M, Lenhart A, Cabezas L, Vargas S, Jaramillo J, *et al*.** Schools as potential risk sites for vector-borne disease transmission: Mosquito vectors in rural schools in two municipalities in Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 2015;31:212-22. https://doi.org/10.2987/moco-31-03-212-222.1

9. **Morales A.** *Aedes aegypti* en zona rural del municipio de La Mesa (Cundinamarca) Colombia, S.A. Biomédica. 1981;1:223-4. https://doi.org/10.7705/biomedica.v1i4.1806

10. **Pérez-Castro R, Castellanos J, Olano V, Matiz M, Jaramillo J, Vargas S, *et al*.** Detection of all four serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111:233-40. https://doi.org/10.1590/0074-02760150363

11. **Thenmozhi V, Tewari S, Manavalan R, Balasubramanian A, Gajanana A.** Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in southern India. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94:507.

12. **Thenmozhi V, Hiriyan J, Tewari S, Samuel P, Paramasivan R, Rajendran R, *et al*.** Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a southern Indian state. Jpn J Infect Dis. 2007;60:245-9.

13. **Romero-Vivas C, Arango-Padilla P, Falconar A.** Pupal productivity surveys to identify the key container habitats of *Aedes aegypti* (L) in Barranquilla, the principal seaport of Colombia. Ann Trop Med Parasitol. 2006;100(Suppl.1):S87-95. https://doi.org/10.1179/136485906X105543

14. **Tinker M, Olano V.** Ecología del *Aedes aegypti* en un pueblo de Colombia, Suramérica. Biomédica. 1993;13:5-14. https://doi.org/10.7705/biomedica.V13i1.2041

15. **González R, Darsie JR Jr.** Clave ilustrada para la determinación genérica de larvas de Culicidae de Colombia y el nuevo mundo. Bol Mus Entomol Univ Valle. 1996;4:21-37.

16. **Tinker M, Stojanovich CJ.** Identification of the pupae of receptacle breeding mosquitoes. Ann Entomol Soc Am. 1962;55:577-82.

17. **Chien L, Liao T, Shu PY, Huang J, Gubler D, Chang G.** Development of real time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. J Clin Microbiol. 2006;44:1295-304. https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006

18. **Staley M, Dorman K, Bartholomay L, Fernández-Salas I, Farfán-Ale J, Loroño-Pino MA, *et al*.** Universal primers for the amplification and sequence analysis of actin-1 from diverse mosquito species. J Am Mosq Control Assoc. 2010;26:214-8. https://doi.org/10.2987/09-5968.1

19. **Grunnill M, Boots M.** How important is vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae)? J Med Entomol. 2016;53:1-19. https://doi.org/10.1093/jme/tjv168

20. **Khin M, Than K.** Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. Am J Trop. Med Hyg. 1983;32: 590-4. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.590

21. **Mbaika S, Lutomiah J, Chepkorir E, Mulwa F, Khayeka-Wandabwa C, Tigoi C, *et al*.** Vector competence of *Aedes aegypti* in transmitting Chikungunya virus: Effects and implications of extrinsic incubation temperature on dissemination and infection rates. Virol J. 2016;13:114. https://doi.org/10.1186/s12985-016-0566-7

22. **Service M.** Culicine mosquitoes (Culicinae). In: Medical Entomology for Students. Cambridge: Cambridge University Press; 2012. p. 52-80. https://doi.org/10.1017/CBO9780511811012.007

23. **Rey J, Lounibos P.** Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. Biomédica. 2015;35:177-85. https://doi.org/10.1590/S0120-41572015000200005

24. **DANE.** Conceptos básicos. Fecha de consulta: 31 de julio de 2016. Disponible en: http://www.dane.gov.co/files/inf_geo/4Ge_ConceptosBasicos.pdf

25. **Bara J, Clark T.** Remold susceptibility of larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to dengue virus. J Med Entomol. 2013;50:179-84.

26. **Joshi V, Mourya D, Sharma R.** Persistence of dengue -3 virus through transovarial transmission passage in successive generation of *Aedes aegypti* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:158-61.

27. **Barrera R.** Recomendaciones para la vigilancia de *Aedes aegypti*. Biomédica. 2016;36:454-62. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2892

Biomédica 2017;37(Supl.2):201-7
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3481

COMUNICACIÓN BREVE

Bionomía de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albimanus* (Diptera: Culicidae) en dos rancherías del pueblo wayúu, Riohacha, La Guajira, Colombia

Airleth Sofía Díaz[1], Aura Isabel Sotelo[1], Catalina González-Uribe[1,2], Helena L. Brochero[3]

[1] Eje de Salud Pública, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Riohacha, capital del departamento de La Guajira, registra las tasas más altas de malaria o paludismo en el departamento, especialmente entre los indígenas de la etnia wayúu.
Objetivo. Describir algunos aspectos de la bionomía de las especies del género *Anopheles* presentes en dos rancherías de la etnia wayúu.
Materiales y métodos. Se hicieron dos muestreos durante las temporadas de lluvia y sequía en las rancherías Marbacella y El Horno (municipio de Riohacha, La Guajira). Se recolectaron formas inmaduras de los mosquitos y se describieron sus hábitats. Los mosquitos adultos se recolectaron al posarse en sujetos humanos, previo consentimiento informado, y con trampas de luz Shannon y CDC.
Resultados. Todos los ejemplares recolectados eran *Anopheles albimanus*, especie que registró actividad de picadura durante toda la noche en el peridomicilio (n=7), en tanto que en el intradomicilio se capturaron solo dos mosquitos entre las 18:00 y las 20:00 horas. Los sitios de cría positivos correspondieron a jagüeyes (n=7; 38,8 %), charcos (n=2; 10,5 %), y estanques piscícolas (n=2; 10,5 %). La mayor abundancia de formas inmaduras se encontró en los jagüeyes (n=25; 78 %), cuyo pH oscilaba entre 7,20 y 7,81 a una temperatura de 26,5 °C, y se localizaban a 150 m de distancia de las viviendas.
Conclusión. *Anopheles albimanus* se registró en todos los depósitos de agua de ambas rancherías. Dado que la especie se considera vector primario de la malaria en la zona, debe establecerse un sistema de vigilancia entomológica local que involucre a la comunidad a la vez que respete su cosmología y actividades rutinarias como la pesca.

Palabras clave: *Anopheles*; malaria; ecología; población indígena; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3481

Bionomics of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albimanus* (Diptera: Culicidae) in two villages of the Wayúu people, Riohacha, La Guajira, Colombia

Introduction: Riohacha, capital of the department of La Guajira, reports the highest rates for malaria in the department, and the most vulnerable people are those of the Wayúu indigenous group.
Objective: To describe some aspects of the bionomics of the *Anopheles* species in two Wayúu settlements.
Materials and methods: Two sampling events were carried out during dry and rainy seasons in Marbacella and El Horno (Riohacha, La Guajira). Immature stages of *Anopheles* spp. were collected, and breeding sites were described. Adult mosquitoes were collected with human landing catches, Shannon traps and CDC traps.
Results: All collected specimens were *Anopheles albimanus.* Biting activity occurred outdoors during all the night (n=7), while indoors, only two mosquitoes were captured between 18:00 and 20:00 hours. The positive breeding sites corresponded to *jagüeyes* (n=7, 38.8%), pools (n=2, 10.5%), and fishponds (n=2, 10.5%). The highest abundance of immature forms was found in the *jagüeyes* (n=25, 78%), which had pH values between 7.20 and 7.81 and a temperature of 25°C, and were located 150 m away from Wayúu homes.

Contribución de los autores:
Airleth Sofía Díaz y Aura Isabel Sotelo: trabajo de campo y de laboratorio, y análisis de datos
Catalina González Uribe: análisis de datos
Helena Brochero: orientación del trabajo en campo y en el laboratorio
Todos los autores participaron en la revisión de los resultados y en la escritura del manuscrito.

Conclusion: *Anopheles albimanus* was the only collected species found in water supply deposits in the villages Marbacella and El Horno. Given that the species is the main vector for malaria in the area, we suggest the implementation of a community-based entomological surveillance system which should respect Wayúu cosmology and routine activities such as fishing.

Key words: *Anopheles*; malaria; ecology; indigenous population; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3481

La transmisión de la malaria, o paludismo, en la región Caribe de Colombia es endemoepidémica (1,2). El departamento de La Guajira, ubicado en dicha región, tiene una población aproximada de 526.148 habitantes, de los cuales 44,9 % son indígenas de la etnia wayúu (3,4), históricamente afectados por enfermedades transmitidas por insectos como la encefalitis equina venezolana en 1996 (5), y la malaria, con más de 5.853 casos registrados en los municipios de Riohacha, Manaure, Dibulla y Maicao en el año 2000 (6,7).

Durante el 2013, año en que se llevó a cabo el presente estudio, La Guajira registró 35 casos de paludismo por *Plasmodium vivax* (8,9) que afectaron a 62 % de la comunidad wayúu (6,10). Riohacha, capital del departamento y municipio donde se encuentran las rancherías Marbacella y El Horno de la etnia wayúu, constituye el segundo municipio endémico para malaria en La Guajira (2,11), y presentó un incremento en la incidencia de la enfermedad de 524 casos por 100.000 habitantes en el 2010 a 701 casos por 100.000 habitantes del área rural en el 2011 (3,8,10). *Anopheles albimanus* Wiedemann 1820 (Diptera: Culicidae), con amplia distribución geográfica en La Guajira (2,9), se considera el vector primario de malaria en ese departamento (9,12,13).

El objetivo de este estudio fue describir algunos aspectos de la bionomía de las especies del género *Anopheles* presentes en dos rancherías de la etnia wayúu.

Materiales y métodos

Las rancherías Marbacella (11° 30’ 24,5” N, 72° 59’ 09,7” O; *World Geodetic System*, WGS 84) (figura 1) y El Horno (11° 30’ 16,35” N, 72° 59’ 21,31” O; WGS84) se encuentran en el área rural de Riohacha, a siete kilómetros de la cabecera municipal. Riohacha registra una población estimada de 170.000 habitantes (11) y corresponde a una zona de bosque seco tropical (Bs-T) (14) con elevaciones entre los 0 y los 45 msnm, una temperatura promedio anual de 28 a 39 °C, una precipitación promedio anual entre 500 y 1.000 mm, y una vegetación típica compuesta por árboles, arbustos y herbáceas, primordialmente de las familias Cactaceae, Capparidaceae, Mimosaceae y Fabaceae.

El clima de la zona se ve modificado por la brisa marina y los vientos alisios del noreste que soplan durante la mayor parte del año y determinan una temporada de lluvias generalmente en los meses de septiembre a noviembre, cuando la zona de convergencia intertropical se desplaza hacia el norte.

Riohacha registró un promedio anual de lluvias de 738 mm, con un promedio de 33 días de precipitaciones, entre 1981 y 2010. Según los testimonios de la población de las dos rancherías, en el 2013 el ciclo de lluvias fue atípico para el departamento, puesto que las precipitaciones fueron menores de lo esperado y se configuró como un año seco para la región (15).

El Horno cuenta con ocho viviendas y Marbacella, con 67, con un promedio de cinco personas por vivienda. En general, las viviendas tienen paredes



Figura 1. Ranchería Marbacella

Correspondencia:
Catalina González-Uribe, Eje de Salud Pública, Fundación Santa Fe de Bogotá, Carrera 7B N° 123- 90, tercer piso, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (57) 603 0303, extensión 5711
catalina.gonzalez@fsfb.org.co

Recibido: 05/08/16; aceptado: 15/08/07

de bahareque sin revocar (78,1 %), suelo de tierra o arena (91,8 %) y techo de cinc (67,1 %); todas cuentan con una cocina y una enramada para el descanso al atardecer en el exterior. La pesca es la actividad principal de sus habitantes, así como la elaboración de artesanías y el pastoreo de ganado caprino. No se cuenta con un puesto de salud local, por lo que los habitantes deben acudir al área urbana de Riohacha para su atención.

Se hicieron tres muestreos de adultos y de formas inmaduras de las especies de *Anopheles* entre los meses de mayo a julio y de septiembre a octubre que, según los registros climatológicos del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM, correspondieron a los meses con mayor precipitación en la región durante el periodo de 1982 a 2010 (16). Los mosquitos adultos se recolectaron al posarse en sujetos humanos, previo consentimiento informado, y empleando trampas de luz Shannon y CDC (17,18). La recolección de mosquitos al posarse en los sujetos se hizo durante 45 minutos cada hora a lo largo de 12 horas (18:00-6:00) en tres días consecutivos, tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio de dos viviendas con historia de episodios previos de malaria. Las capturas estuvieron a cargo de parejas compuestas por personas capacitadas que se rotaban entre el intradomicilio y el peridomicilio cada dos horas, con el fin de evitar efectos de sesgo en el muestreo. Las trampas CDC se colocaron en el peridomicilio durante doce horas a partir de las 18:00 horas, en tanto que las trampas Shannon se colocaron en el exterior de las viviendas entre las 20:00 y las 22:00 horas durante los mismos tres días consecutivos. El peridomicilio se estableció como el perímetro de diez metros alrededor de la vivienda, y el extradomicilio, como el área comprendida más allá del peridomicilio. Los mosquitos *Anopheles* spp. se capturaron con aspirador manual y se mantuvieron vivos con solución azucarada al 10 % (17,18) en frascos plásticos etiquetados con la hora, lugar y tipo de muestreo, con el fin de obtener las isofamilias.

En cada ranchería se hizo el reconocimiento del área circundante en un radio de 1 km, aproximadamente, con el propósito de describir los posibles criaderos de las especies de *Anopheles* presentes y aquellos registrados por la Secretaría Departamental de Salud de La Guajira. Se inspeccionaron los cuerpos de agua con base en los datos de georreferenciación, de pH, de temperatura del agua a diez cm de profundidad, y de vegetación emergente, flotante o circundante, y se recolectaron larvas de tercer y cuarto estadio con el método del cucharón (10 cucharones por cada metro cuadrado de superficie) (18). Las larvas recolectadas se preservaron con agua del criadero en frascos limpios de 15 ml, y se separaron larvas de cuarto estadio para la obtención de las exuvias y los adultos emergentes (18).

El manejo de este material biológico se ciñó a la normatividad para la recolección, el empaque, el transporte, la remisión y el manejo en el laboratorio de muestras entomológicas, contemplada en los lineamientos nacionales para el manejo de las enfermedades transmitidas por vectores (19). Las formas inmaduras se procesaron para su montaje permanente, los adultos se montaron en alfiler (20), y la determinación taxonómica se hizo con base en los caracteres morfológicos (20,21).

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Entomología, Área de Genética de Insectos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Aspectos éticos

La recolección del material entomológico estuvo a cargo de funcionarios de la Secretaría Departamental de Salud de La Guajira y de los investigadores del estudio, quienes firmaron un consentimiento informado en el que se explicaba su objetivo y los posibles riesgos. Las actividades de recolección de insectos se explicaron a la comunidad wayúu de las rancherías Marbacella y El Horno, cuyos líderes aprobaron el desarrollo del proyecto "Coconstrucción de una estrategia de Ecosalud para la prevención, vigilancia y control de enfermedades transmitidas por vectores en comunidades indígenas de Colombia". El proyecto contó con el aval del Comité Corporativo de Ética en Investigación de la Fundación Santa Fe de Bogotá (Acta N° 7 del 6 de mayo de 2013).

Resultados

Se recolectaron 13 hembras adultas silvestres (n=11; 84,6 %) al posarse en los sujetos humanos, con 154 horas de esfuerzo. Dos (15,3 %) mosquitos se recolectaron mediante búsqueda directa en abrigo animal, con 1,15 horas de esfuerzo. No se obtuvieron isofamilias de los mosquitos recolectados. Tras 62 horas de exposición de las trampas CDC y tres de las trampas Shannon, no se recolectaron mosquitos adultos del género *Anopheles*. Todos los especímenes recolectados eran *An. (Nyssorhynchus) albimanus.* Dada la poca cantidad de mosquitos, no fue posible determinar el patrón de la actividad hematófaga. Sin embargo,

se capturaron cuatro (36,6 %) mosquitos en el intradomicilio: dos entre las 18:00 y las 20:00 horas, y dos entre las 21:00 y las 23:00 horas; y en el peridomicilio se capturaron siete (63,6 %) mosquitos: dos entre las 18:00 y las 20:00 horas, cuatro entre la 1:00 y las 3:00 horas, y uno entre las 5:00 y las 6:00 horas.

Se describieron diecinueve criaderos en las rancherías Marbacella y El Horno (cuadro 1), 11 de los cuales fueron positivos para larvas de *An. albimanus*. El hábitat más frecuente fueron los jagüeyes (n=7; 38,8 %), es decir, excavaciones en el suelo, de origen antrópico, utilizadas para el almacenamiento de aguas lluvias y de escorrentía para uso doméstico. El agua se encontró turbia, con fondo lodoso y, en algunos casos, con materia orgánica y vegetación emergente y flotante. Los jagüeyes tenían una profundidad entre uno y tres m, y su área fluctuaba entre los 200 y los 12.000 m; la vegetación circundante estaba compuesta por leguminosas, cactáceas y herbáceas. El jagüey más cercano a las viviendas se encontró a 51 m, justo entre las dos rancherías (cuadro 2). Los charcos (n=2) representaron 10,5 % del total de los criaderos con presencia de la especie; estos son pequeñas depresiones naturales del terreno que acumulan agua lluvia y son menos profundos que los jagüeyes (profundidad máxima de 0,7 m), con suelos lodosos o arenosos; en ellos se encontró materia orgánica, así como leguminosas, cactáceas y herbáceas circundantes y emergentes. En los estanques piscícolas, excavaciones de origen antrópico con el propósito de almacenar agua para la cría de camarones, con un pH entre 7,35 y 7,51 y una temperatura entre los 26 y los 31 °C, de fondo lodoso y con vegetación emergente, flotante y circundante asociada, también se encontraron formas inmaduras de la especie (n=2).

Cuadro 1. Características de los cuerpos de agua, temporales y permanentes, en las rancherías Marbacella y El Horno

Características del criadero		Número de criaderos
Origen	Natural	8
	Antrópico	11
Tipo	Jagüey	7
	Estanque piscícola	4
	Potrero inundado	5
	Charco	2
	Caño	1
Duración	Temporal	17
	Permanente	2
Nivel de agua en época de sequia	Bajo	19
	Medio	0
	Alto	0
Presencia de vegetación en época de sequía	Circundante	16
	Emergente	2
	Flotante	1
Unidad de paisaje	Arbustal	18
	Herbazal	1
Fuente de recarga	Lluvia y escorrentía	-
Ancho máximo promedio (m)	62,26	-
Largo máximo promedio (m)	172,21	-
Profundidad máxima promedio (m)	1,7	-
Área promedio (m^2)	10.220,73	-
Altitud máxima (msnm)	10	-
Altitud mínima (msnm)	0	-
Usos	Bebedero de animales, uso doméstico	-
Suelo	Arena	-

Discusión

Anopheles albimanus constituyó la única especie registrada en las rancherías Marbacella y El Horno, tanto en sus formas inmaduras como adultas. Esta especie se considera uno de los principales vectores de malaria en Colombia (14,22-24). Las capturas solo se lograron durante los meses de septiembre a octubre, en los cuales se registró la mayor precipitación, con 155 mm y 183 mm, respectivamente (25). *Anopheles albimanus* se considera una especie oportunista (26,27) que puede adaptarse a criaderos en función de las precipitaciones y de la presión antrópica, y que busca reservorios de agua para uso doméstico (28,29).

En general, los cuerpos de agua registrados en la zona de estudio presentaban áreas grandes, hasta de 22.800 m^2, con una profundidad máxima de tres m, y estaban situados cerca de las viviendas, ya que la comunidad wayúu los utiliza en todas las actividades rutinarias, como el lavado de la ropa y el baño diario, y para el consumo humano y de los animales, entre otros. Es claro que los jagüeyes constituyen los criaderos más aptos para la especie, con nutrientes esenciales derivados de las aguas de escorrentía, exposición al sol que asegura la conversión de ácidos grasos esenciales para las formas inmaduras (30) y espejos de agua que cubren entre 4.000 y 24.000 m^2, lo cual permite el crecimiento de vegetación que sirve de refugio de las larvas frente a los depredadores (8,31,32).

Esta situación permite la aparición de criaderos permanentes y temporales cercanos a las viviendas y asegura una fuente de alimento para los mosquitos adultos, así como la diversidad de hábitats que contribuyen a la amplia distribución

Cuadro 2. Cuerpos de agua positivos para *Anopheles albimanus* en las rancherías Marbacella y El Horno

Ubicación	Tipo de criadero	Distancia a la vivienda más cercana (m)	Área (m^2)	Profundidad máxima (m)	Temperatura del agua (°C)	pH	Número de larvas
El Horno	Jagüey	141	12.000	1,8	26,6	7,20	7
El Horno	Jagüey	132	2.294	1,8	26,7	7,81	8
El Horno	Estanque piscícola	600	22.800	2	26	7,35	2
El Horno	Estanque piscícola	200	10.500	1	31	7,51	1
Marbacella	Jagüey	51	2.400	1	29,65	7,32	2
El Horno	Charco	300	65	0,5	29,8	6,97	1
Autopista, margen izquierda (ranchería Marbacella)	Charco	300	500	0,10	26,8	7,45	3
Marbacella	Jagüey	200	2.000	2	28,2	7,12	2
Marbacella	Jagüey	200	6.000	3	29,4	7,63	1
Autopista, margen izquierda (ranchería Marbacella)	Jagüey	300	390	3	31,4	8,25	4
Autopista, margen izquierda (ranchería Marbacella)	Jagüey	600	200	3	31,9	7,25	1

geográfica característica de *An. albimanus* tanto en áreas rurales como urbanas (20,33). Las larvas suelen desarrollarse aprovechando criaderos de gran extensión, en aguas dulces o salobres, limpias, o con alto contenido de materia orgánica, aunque también se pueden encontrar larvas en pequeños depósitos de agua, preferiblemente naturales, por presión de la selección y por oportunismo, así como en recipientes artificiales (26,28,33-35).

La Guajira registra nueve especies de *Anopheles* (7,9,11,13) y la presencia de los tres principales vectores de malaria en el país: *An. albimanus*, *An. darlingi* Root *y An. nuneztovari* Gabaldon; sin embargo, en la epidemia de malaria de 1999 a 2000, solo se incriminó a *An. albimanus* (7,35). Muchos factores confluyeron en la epidemia de malaria en La Guajira, pero el incremento de la precipitación, que generó inmensos criaderos aptos para la especie, fue esencial para el aumento de las poblaciones (7). Sin embargo, en la época seca los mosquitos adultos también pueden encontrar refugio, pues vuelan grandes distancias (26), y mantener las características genéticas propias de una metapoblación aptas para su adaptación ecológica durante todo el año (26,29,36-40).

Anopheles albimanus se describe como una especie predominantemente exofágica, con preferencia por animales, que presenta actividad hematófaga durante toda la noche (13,26,28,29,36). A pesar de la poca cantidad de adultos recolectados durante este estudio, existe un gran riesgo de transmisión de la malaria, pues los ejemplares se encontraron picando a humanos hacia el crepúsculo, momento en que se desarrollan múltiples actividades domésticas en el peridomicilio, y hacia la media noche, cuando las personas se encuentran durmiendo y no tienen defensas para las picaduras, a menos que se cubran con mosquiteros (12,24,29,40-43).

El comportamiento y la distribución de algunos vectores de la malaria se relacionan estrechamente con las condiciones climáticas, especialmente la temperatura y las precipitaciones (44,45). Se ha planteado la hipótesis de que el cambio global en el clima generará condiciones desfavorables para *An. albimanus* en ciertas regiones de Mesoamérica, incluida La Guajira, lo cual podría ocasionar un desplazamiento de la especie a zonas con condiciones más favorables para su desarrollo, aumentando así su rango de distribución geográfica (46). Sin embargo, esta transición hacia un incremento en la temperatura ambiental puede contribuir a aumentar el riesgo de transmisión de la enfermedad debido a que los ciclos gonotróficos se hacen más cortos, y ello se traduce en un mayor número de picaduras (47). Las características abióticas de la zona, la cosmología de sus habitantes y las necesidades básicas insatisfechas de la comunidad wayúu, exigen la ejecución de programas de prevención, control y vigilancia de insectos vectores que involucren el manejo ambiental, la planificación, la organización y la implementación de estrategias para disminuir la carga de la enfermedad en esta zona del país. Es muy importante promover las buenas prácticas para el manejo del agua y de los residuos sólidos, así como las alertas tempranas durante los períodos de precipitación típicos de la zona (48).

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del cuerpo administrativo y técnico de la Secretaría de Salud de La Guajira, por el apoyo logístico y técnico en

campo, y a los pobladores de las rancherías Marbacella y El Horno, por permitirnos la entrada a su comunidad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses con respecto a los contenidos del manuscrito.

Financiación

Este estudio hizo parte del proyecto "Co-construcción de una estrategia de Ecosalud para la prevención, vigilancia y control de enfermedades transmitidas por vectores en comunidades indígenas de Colombia", financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) (código de programa 5016-53730914), y hace parte de la Iniciativa Latinoamericana de Ecosalud en ETV apoyada por el Centro Internacional de Investigación para el Desarrollo (IDRC).

Referencias

1. **Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.** Transmisión epidémica de la malaria en Colombia. Sivigila, semana epidemiológica N° 10 de 2002. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2002.
2. **Rodríguez J, Uribe G, Araújo R, Narváez P, Valencia S.** Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(Supl.1):114-22. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900015
3. **Secretaría Departamental de Salud, Gobernación de La Guajira.** Análisis de situación en salud (ASIS) del departamento de La Guajira 2011. Riohacha: Secretaría Departamental de Salud; 2012.
4. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística.** Perfiles censo general 2005. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2017. Disponible en: https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/censo-general-2005-1.
5. **Rivas F, Díaz L, Cárdenas V, Daza E, Bruzón L, Alcalá A, *et al.*** Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia 1995. J Infect Dis. 1997;175:828-32.
6. **Instituto Nacional de Salud.** Informe epidemiológico de evento. Malaria, periodo XII de 2013. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2013. Fecha de consulta: 22 de julio de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/MALARIA%202013.pdf.
7. **Servicio de Erradicación de la Malaria.** Plan para la erradicación de la malaria en Colombia. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Bogotá: Ministerio de Salud; 1957. p. 235.
8. **González A.** Epidemia de malaria en La Guajira: una muestra lamentable de la situación de salud pública en el país. Biomédica. 2000;20:151-2.
9. **Cáceres DC, de la Hoz F, Nicholls S, De Antonio R, Velandia M, Olano V, *et al*.** Brote de malaria en La Guajira, 1° de diciembre de 1999 a 1° de febrero de 2000. Biomédica. 2000;20:152-61.
10. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Indicadores básicos en salud, 2014. Situación de salud en Colombia. Bogotá: Minsalud; 2014. p. 137.
11. **Herrera-Varela M, Orjuela L, Peñalver C, Conn J, Quiñones M.** *Anopheles* species composition explains differences in *Plasmodium* transmission in La Guajira, northern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:952-6. https://doi.org/10.1590/0074-0276140126
12. **Gutiérrez L, González J, Gómez G, Castro M, Rosero D, Luckhart S, *et al*.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Córdoba and Antioquia states in northwestern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1117-24. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800008
13. **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, *et al*.** Malaria vector species in Colombia - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(Supl.1):223-38. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028
14. **Holdrige LR.** Life zone ecology. San José Costa Rica: Tropical Science Center; 1967. p. 206.
15. **Santodomingo A, Castro-Díaz L, González-Uribe C.** Ecosystem research experience with two indigenous communities of Colombia: The Ecohealth calendar as a participatory and innovative methodological tool. EcoHealth. 2016;13:687-97. https://doi.org/10.1007/s10393-016-1165-1
16. **Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.** Promedios climatológicos 1981-2010. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2016. Disponible en: http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/clima.
17. **World Health Organization.** Malaria entomology and vector control. Learner´s Guide (Internet). Geneva: World Health Organization; 2003. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CPE_SMT_2002.18_Rev.1_PartI.pdf.
18. **Service MW.** Mosquito ecology: Field sampling methods. Second edition. Londres; Elsevier Applied Science; 1975. p. 988.
19. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de la malaria. Bogota: Minsalud, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud; 2011. p. 130.
20. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Cali: Universidad del Valle; 2007. p. 260.
21. **Faran M, Linthicum KJ.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1981;13:1-81.
22. **Herrera S, Suárez M, Sánchez G, Quiñones M, Herrera M.** Uso de la técnica inmunorradiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoitos de *Plasmodium*. Colombia Médica. 1987;18:2-6.
23. **Quiñones M, Suárez M, Fleming G.** Distribución y bionomía de los anofelinos de la Costa Pacífica de Colombia. Colombia Médica. 1987:18:19-23.
24. **Olano V, Brochero H, Sáenz R, Quiñones M, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica. 2001;21:402-8.

25. **Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.** Boletín climatológico mensual 2013. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/climatologico-mensual.

26. **Frederickson EC.** Bionomics and control of *Anopheles albimanus*. Technical paper No. 34. Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 1993.

27. **Scorza J, Rodríguez E, Moreno G.** Ecología poblacional de *Anopheles nuñeztovari* Gabaldon 1940, en el occidente de Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb. 1981;XXI:1-27.

28. **CIDEIM.** Manual de entomología médica para investigadores de América Latina. Cali: CIDEIM; 1994. p. 163-212.

29. **Rubio-Palis Y.** *Anopheles* (*Nyssorhyctus*) de Venezuela. Taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Maracay: Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldón" y el Proyecto de Control de Enfermedades Endémicas; 2000.

30. **Rejmánková E, Grieco J, Achee N, Roberts DR.** Ecology of larval habitats. En: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Rijeka (HR): InTech; 2013. https://doi.org/10.5772/3392

31. **Ageep TB, Cox J, Hassan MM, Knols BG, Benedict MQ, Malcolm CA, *et al*.** Spatial and temporal distribution of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in northern Sudan: Influence of environmental factors and implications for vector control. Malar J. 2009;7:123-36. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-123

32. **Merritt RW, Dadd RH, Walker ED.** Feeding behaviour, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. Ann Rev Entomol. 1992;37:349-76. https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002025

33. **González R.** Efecto del criadero sobre la duración del ciclo de vida y productividad de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). Bol Mus Entomol Univ Valle. 2005;6:1-6.

34. **Mendizábal M, Peraza I, Pérez M, Valdés V, Molina R, Marquetti MC.** Presencia larval de *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) en La Habana, Cuba, 2010-2012. Rev Cubana Med Trop. 2010;66:241-51.

35. **Porras A, De la Hoz F, Velandia MP, Olano VA, Cáceres DC, Rojas LJ, *et al.*** Epidemia de malaria en La Guajira, enero a noviembre del 2000: balance final. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2001;6:205-14.

36. **Pan American Health Organization.** Biology and ecology of *Anopheles albimanus* Wiedemann in Central America. Washington, D.C.: PAHO; 1996. p. 32.

37. **González R, Martínez LM.** Nuevo registro de distribución altitudinal de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). Bol Mus Entomol Univ Valle. 2006;7:19-23.

38. **Solarte Y, González R, Hurtado JC, Alzate A.** Influencia de la vegetación en la presencia, distribución y abundancia de criaderos de tres especies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) en la parte baja del río Naya, costa Pacífica de Colombia. Bol Mus Entomol Univ del Valle. 1994;2:55-72.

39. **Rubio-Palis Y, Menare C, Quinto A, Magris M, Amarista M.** Caracterización de criaderos de anofelinos (Diptera: Culicidae) vectores de malaria del Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. Entomotrópica. 2005;20:29-38.

40. **Warrel D, Gilles H.** Essential malariology. Cuarta edición. Londres: CRC Press; 2002; p. 384.

41. **Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JA.** Climate change and vector-borne diseases: A regional analysis. Bull World Health Organ. 2000;78:1136-47.

42. **Olano V, Carrasquilla G, Méndez F.** Transmisión de la malaria urbana en Buenaventura, Colombia: aspectos entomológicos. Rev Panam Salud Pública. 1997;1:287-94. https://doi.org/10.1590/S1020-49891997000400005

43. **Olano VA, Carrillo MP, Espinal CA.** Estudios de infectividad de la especie *Anopheles albimanus* Wiedemann 1820 (Díptera: Culicidae) cepa Cartagena con plasmodios humanos. Biomédica 1985;5:5-10. https://doi.org/10.7705/biomedica.v5i1-2.1895

44. **Stresman GH.** Beyond temperature and precipitation: Ecological risk factors that modify malaria transmission. Acta Trop. 2010;116:167-72. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.005

45. **Mantilla G, Oliveros H, Barnston A.** The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960-2006. Malar J. 2009;8:6. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-6

46. **Fuller DO, Ahumada ML, Quiñones ML, Herrera S, Beier JC.** Near-present and future distribution of *Anopheles albimanus* in Mesoamerica and the Caribbean Basin modelled with climate and topographic data. Int J Health Geogr. 2012;11:13. https://doi.org/10.1186/1476-072X-11-13

47. **Rúa GL, Quiñones ML, Vélez ID, Zuluaga JS, Rojas W, Poveda G.** Laboratory estimation of the effects of increasing temperatures on the duration of gonotrophic cycle of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:515-20. https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000500011

48. **World Health Organization.** World Malaria Report 2013. Geneva: WHO; 2013.

Biomédica 2017;37(Supl.2):208-14
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3435

COMUNICACIÓN BREVE

Detección de *Leishmania* (*V*) *guyanensis* en ejemplares de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) recolectados en pecaríes de collar (*Pecari tajacu*)

Jesús E. Rojas-Jaimes[1], Germán H. Correa-Núñez[2], Nyshon Rojas-Palomino[3], Omar Cáceres-Rey[1,4]

[1] Laboratorios de Biología Molecular y Celular, Escuela de Medicina Humana, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú
[2] Departamento Académico de Ciencias Básicas, Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Madre de Dios, Perú
[3] Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú
[4] Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú

Introducción. En estudios previos se detectó la presencia de *Leishmania infantum* en *Rhipicephalus sanguineus*, lo cual planteaba la posibilidad de que *R. sanguineus* transmitiera la leishmaniasis a una variedad de huéspedes.
Objetivo. Identificar *Leishmania* (*Viannia*) spp. en garrapatas recolectadas en animales silvestres de una zona endémica para leishmaniasis.
Materiales y métodos. Se hicieron 81 extracciones individuales de ADN en las garrapatas recogidas de tres tapires o dantas (*Tapirus terrestres*) y tres pecaríes de collar (*Pecari tajacu*) cazados en Madre de Dios, Perú. Las garrapatas recolectadas se identificaron taxonómicamente y se prepararon para la identificación del cinetoblasto (kDNA) de *Leishmania* (*Viannia*) spp. mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como de la especie de *Leishmania* mediante PCR de fusión de alta resolución (*High Resolution Melt*, HRM).
Resultados. Se detectó el kDNA de *Leishmania* (*V*) spp. en tres garrapatas silvestres de *R.* (*Boophilus*) *microplus*, Canestrini, 1888, recolectadas en un pecarí de collar cazado en la selva de Madre de Dios. El análisis mediante HRM-PCR evidenció que una de las muestras positivas de kDNA tenía una curva compatible con *L.* (*V*) *guyanensis*.
Conclusión. Los resultados evidenciaron la presencia de ADN de *L.* (*V*) *guyanensis* en *R.* (*Boophilus*) *microplus*, probablemente adquirida después de picar al pecarí. Es importante hacer nuevos estudios para aclarar la participación de *R.* (*Boophilus*) *microplus* en la transmisión de la leishmaniasis.

Palabras clave: *Leishmania guyanensis*; leishmaniasis; *Rhipicephalus*; artiodáctilos; Perú

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3435

Detection of *Leishmania* (*V*) *guyanensis* in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) collected from *Pecari tajacu*

Introduction: Previous studies identified the presence of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* and indicated the possibility that it could transmit leishmaniasis to a variety of hosts.
Objective: To identify parasites of *Leishmania* (*Viannia*) spp. in ticks collected from wild animals in an endemic area for leishmaniasis.
Materials and methods: We performed 81 individual DNA extractions from ticks collected from three *Tapirus terrestris* and three *Pecari tajacu* in Madre de Dios, Perú. Ticks were taxonomically identified and they were subsequently prepared to identify *Leishmania* (*Viannia*) spp. kDNA by PCR and the species of *Leishmania* by HRM-PCR.
Results: *Leishmania* (*Viannia*) kDNA was detected in three wild ticks of the species *R. microplus*, collected from a collard peccary (*P. tajacu*) hunted in the forests of Madre de Dios. The HRM-PCR showed that one of the positive samples had a kDNA curve compatible with *L.* (*V*) *guyanensis.*

Contribución de los autores:
Jesús E. Rojas-Jaimes, Germán H. Correa-Nuñez: concepción y diseño del estudio, recolección e interpretación de los datos y redacción del manuscrito
Nyshon Rojas-Palomino: diseño del estudio molecular para identificación de especies de Leishmania y análisis de resultados
Omar Cáceres-Rey: diseño del estudio molecular
Todos los autores participaron en la revisión crítica del manuscrito.

Conclusion: The results showed the presence of *L*. (*V*) *guyanensis* DNA in *R. microplus* possibly acquired after biting a collarde peccary. Therefore, it is important to design future studies to clarify *R. microplus* involvement in the transmission of leishmaniasis.

Key words: *Leishmania guyanensis*; leishmaniasis; *Rhipicephalus*; artiodactyla; Peru.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3435

En América, los flebotomíneos del género *Lutzomyia* son vectores de parásitos del género *Leishmania*. Sin embargo, se ha sugerido que las garrapatas también pueden ser vectores de especies de *Leishmania*, como lo reporta un estudio previo en algunos lugares de Suramérica donde la leishmaniasis está presente y el vector natural no se ha encontrado (1). En otro estudio se detectó *Leishmania infantum* en *Rhipicephalus sanguineus* recolectadas de perros, los cuales podrían infectar a los humanos (2).

Estos datos sugieren que existen otros artrópodos que pueden ser vectores de la leishmaniasis. Además, en un estudio se encontró que 50 % de las garrapatas analizadas estaban infectadas con *Leishmania* spp. viables, según la identificación del ARN de parásitos en perros que sufrían de leishmaniasis visceral (3). Este porcentaje es mayor que el que se encuentra en el vector natural, es decir, *Lutzomyia longipalpis* (3). En este contexto, es necesario aclarar si las garrapatas son vectores de la leishmaniasis en los perros. Otros resultados dicientes sobre la posible relación entre garrapatas y leishmaniasis fue la detección de la transmisión transovárica de *L. infantum* en *R. sanguineus* (3). Sin embargo, la hipótesis de que *R. sanguineus* es un vector sigue generando controversia, especialmente en áreas en donde aún no se ha encontrado el vector natural (2,4). Además, en otros estudios se encontró ADN del cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum* en la glándula salival de *R. sanguineus* en Brasil e Italia (5-7).

Por otro lado, el pecarí de collar, *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758), presenta un amplio rango de distribución y es la base de la alimentación de diversas comunidades indígenas y, además, existe un apreciable intercambio de pieles de pecarí entre Perú y Brasil, por lo que el contacto con este animal y con sus ectoparásitos, como las garrapatas, es evidente, especialmente entre los nativos, los agricultores, los mineros y los investigadores que ingresan a su hábitat (8). Esta especie vive en manadas de ocho individuos en promedio, sus hábitos son diurnos y nocturnos, y en sus recorridos puede llegar a abarcar un área de 123 hectáreas, en promedio, por lo cual podría ocasionar una significativa dispersión de ectoparásitos (8). Actualmente, no hay información sobre si el pecarí de collar es reservorio o huésped de parásitos del género *Leishmania*. Dicha asociación debe investigarse dado que ya se ha detectado *Leishmania* spp. en garrapatas recolectadas en perros (7).

En este sentido, el objetivo del presente estudio fue la detección e identificación molecular de *Leishmania* spp. en garrapatas recolectadas en ejemplares de *P. tajacu* y *Tapirus terrestris*, los cuales son cazados por los pobladores del área de estudio para su subsistencia, y pueden constituir un factor de riesgo de transmisión de patógenos a la población que entra en contacto con ellos.

Materiales y métodos

Aspectos éticos y trabajo de campo

Esta investigación fue aprobada por la Oficina de Salud Pública y Medio Ambiente del Consejo Regional de Madre de Dios, Perú. En el estudio, las pruebas para la identificación de *Leishmania* spp. se completaron con procedimientos de laboratorio ajustados a las guías internacionales sobre la investigación con animales y las normas del Comité de Cuidado y Uso de Animales del Área de Investigación en Salud de la Junta del Consejo Regional de Madre de Dios.

El estudio se llevó a cabo en dos lugares de la cuenca del río Tahuamanu, situado en la región de Madre de Dios, en las provincias de Tahuamanu y Tambopata, Perú, cerca de la frontera con Bolivia. El sitio 1 incluía el área cercana a la ciudad de San Lorenzo (11°27’13,73”S, 69°20’2,54”O; World Geodetic System (WGS) 84, 285 msnm), capital del distrito de Tahuamanu, en la provincia de Tahuamanu, y el sitio 2, a Pueblo Botijón (12°07’12,95”S, 69°04’31,47”O; WGS 84, 267 msnm), cercano a la ciudad de Planchón, capital del distrito de Las Piedras, en la provincia de Tambopata (figura 1).

Correspondencia:
Jesús Eduardo Rojas, km 19, Panamericana Sur, Villa El Salvador, Lima, Perú
Teléfono: (511) (99) 363 8840
jesus.rojas.jaimes@gmail.com

Recibido: 27/07/16; aceptado: 16/08/17

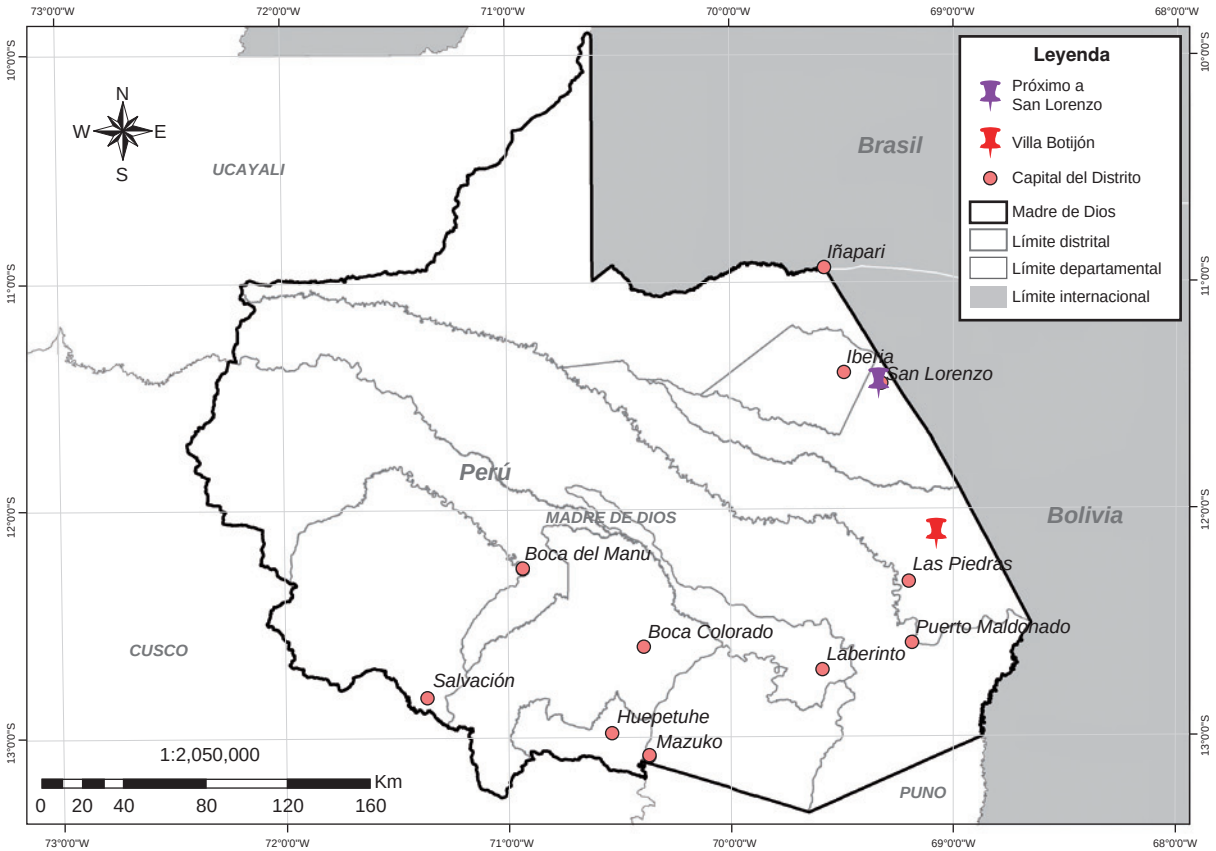


Figura 1. Área de estudio en la región Madre de Dios. Sitios de muestreo: área próxima a la ciudad de San Lorenzo (sitio 1) y Villa Botijón (sitio 2)

Los sitios de recolección se ubicaron en una zona forestal donde normalmente hay caza de animales silvestres sin restricción, pues está fuera de las zonas de reserva. Además, alrededor de los sitios de estudio, en el distrito de Las Piedras, hay áreas endémicas de leishmaniasis en donde los pacientes han reportado que la enfermedad se produce por la picadura de las garrapatas, información que ha sido registrada por el personal de salud de la Dirección Regional de Salud de Madre de Dios en el curso de la vigilancia epidemiológica. En el periodo de 12 meses del estudio, se recogieron ocho reportes orales de este tipo. En cuanto al clima, el área de estudio tiene una precipitación media anual de 1.600 mm y una temperatura media anual de 25 °C. El área se clasifica en la zona de vida de selva húmeda tropical. Durante la recolección el clima fue cálido y húmedo.

En junio de 2012, se entró en contacto con la población local con el fin de hacer los arreglos necesarios para desarrollar la recolección de garrapatas según el proyecto aprobado. Los animales silvestres provenían de la caza local para el consumo. A las tres horas del sacrificio del animal, se recolectaron con una pinza las garrapatas de la región abdominal y se colocaron de forma individual en crioviales de 2 ml con alcohol etílico al 96 %, que luego se rotularon con un código de identificación del lugar de recolección y el animal del cual provenía la muestra.

Se seleccionaron los animales que presentaban más infestación con garrapatas, abundantes en la zona, ya que sus ectoparásitos se depositan en las hojas de las plantas, lo cual constituye un factor de riesgo para la infestación de garrapatas en los humanos.

Clasificación taxonómica y estudios moleculares

Las garrapatas se trasladaron al Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud del Perú en Lima, y se identificaron utilizando las claves de Barros-Battesti, *et al*. (9).

Para la identificación de los parásitos de *Leishmania*, inicialmente se extrajo el ADN de las garrapatas con el estuche Gentra Puregene (QIAGEN) siguiendo el protocolo de aislamiento de ADN en tejidos (10).

Las garrapatas se cortaron en cuatro a seis piezas y se colocaron en un microtubo de 1,5 ml con 300 µl de solución de lisis celular. Dependiendo del tamaño de la garrapata, se agregó un volumen de proteinasa K (1,5 µl, 5 µl o 20 µl), se mezcló suavemente con el mezclador de vórtice, se centrifugó solo si era necesario, y se incubó a 55 °C durante toda la noche. Luego se añadieron 100 µl de la solución hipertónica para precipitación de proteínas, se agitó vigorosamente durante 20 segundos, y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se recolectó y se mezcló con 300 µl de isopropanol frío y se agitó suavemente por inversión 50 veces para después centrifugarlo durante 10 minutos a 13.000 rpm, y mantenerlo en el congelador durante una hora a -10 °C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante con cuidado, se colocó el tubo invertido en un pedazo de papel absorbente blanco y se dejó secar al aire durante 5 minutos. Se añadieron 60 µl de solución de hidratación (agua para biología molecular) y se agitó durante cinco segundos. Por último, se incubó a 65 °C durante una hora para hacer soluble el ADN.

Se utilizó una PCR en cada muestra para detectar el ADN del cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* (*Viannia*) spp. Los cebadores para la amplificación fueron los siguientes: MP1-L: 5'-TAC TCC CCG ACA TGC CTC TG-3' y MP3-H: 5'GAA CGG GGT TGT TTC ATG C-3' (11). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final por reacción de 20 µl, que contenían 4 µl de ADN, 2 µl de solución tampón 10X PCR (Invitrogen), 1 µl de cada cebador (10 µM), 0,2 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen, Grand Island, NY), 0,6 µl de 50 mM de $MgCl_2$ y 2 µl de 1,25 mM de cada dNTP. Se hizo desnaturalización inicial a 94 °C durante cinco minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación a 58 °C durante 45 segundos, una extensión a 72 °C durante 60 segundos, y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos. Como control positivo se usó la cepa de referencia LTB-300 (*L.* (*V*) *braziliensis*) y, como control negativo, agua para biología molecular. El producto esperado fue de 70 pb y se visualizó usando geles de agarosa al 2 %.

Para la identificación de *Leishmania* spp., se utilizó una PCR de fusión de alta resolución (HRM-PCR) con una concentración de 5 ng/µl de ADN y 0,7 µM de los cebadores OL1 – Directo 5´ GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3´ y OL2- Reverso 5´CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3´ (12). La PCR-HRM consistió en 35 ciclos así: desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y una extensión a 72 °C durante 10 segundos, seguidos por un aumento progresivo de la temperatura de 1 °C en el intervalo de 75 a 95 °C para lograr la desnaturalización del amplicón de doble cadena y la disociación del fluoróforo (Eva Green, Qiagen).

El análisis de las curvas de disociación para la diferenciación de especies de *Leishmania* y el kDNA positivo se hizo en las áreas de las muestras con problemas, las cuales se compararon con las áreas de las cepas de referencia mediante el algoritmo del programa Rotor Gene Q, versión V2.1.0. Solo las áreas con una confianza de similitud mayor de 90 % comparada con el área de la cepa de referencia, se definieron como muestras ya genotipificadas. Este método permitió identificar cuatro curvas diferentes de modelo, que correspondían a cada una de las siguientes cepas de referencia de *Leishmania*: *Leishmania* (*V*) *braziliensis*, *L*. (*V*) *peruviana*, *L*. (*V*) *guyanensis* y *L*. (*Leishmania) amazonensis*. Como control negativo, se utilizó el ADN de garrapata negativo para kDNA (código 80) y, como control blanco, el agua para biología molecular. Para las PCR ejecutadas no se realizaron pruebas de inhibición ni tampoco nuevas amplificaciones de las muestras con poca cantidad de ADN blanco.

Resultados

Se recolectaron 81 garrapatas, de las cuales 40 (49,4 %) correspondieron al género *Amblyomma* y provenían de tres ejemplares adultos de *T. terrestres*, y las otras 41 (50,6 %) pertenecían al género *Rhipicephalus* y provenían de tres ejemplares adultos de *P. tajacu.*

Mediante el análisis de la PCR del kDNA de las garrapatas recolectadas, se detectaron tres muestras positivas para *Leishmania* (*Viannia*) spp. (figura 2), una con una banda muy débil. Todas las garrapatas positivas eran machos de la especie *R.* (*Boophilus*) *microplus* recolectados en ejemplares de *P. tajacu* en la localidad de Botijón, pero no se determinó a cuál de los tres pecaríes pertenecían; la prevalencia fue de 7,3 % ($IC_{95\%}$ 1,5-19,9).

El análisis de HRM-PCR en las garrapatas positivas evidenció que solo una de ellas (código 65) tenía una curva similar a *Leishmania* (*V) guyanensis* (figura 3), en tanto que en las otras dos no se pudo detectar correspondencia con las curvas de referencia. En el caso de la correspondiente al código 80, aunque sí generó una curva, las condiciones de saturación de la PCR no permitieron relacionarla con ninguna

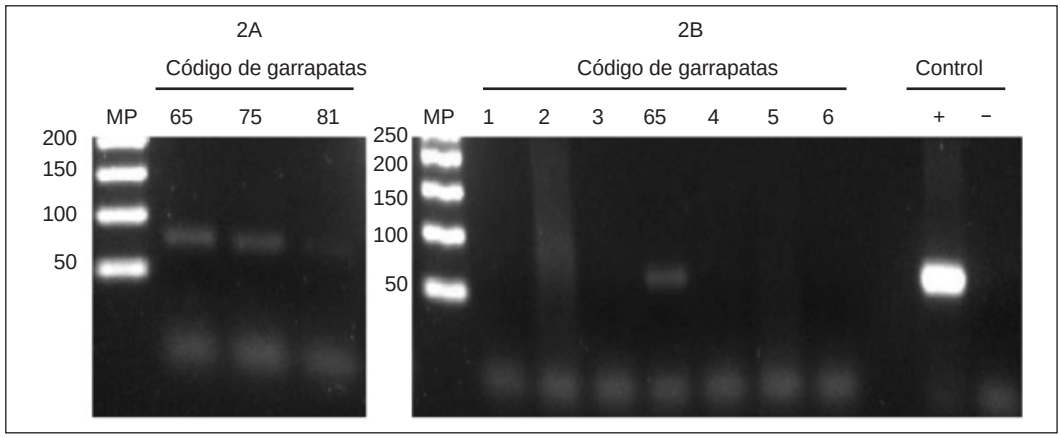
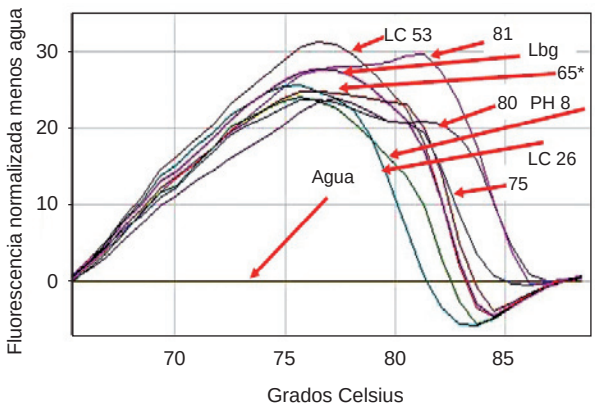


Figura 2. Detección de *Leishmania* (*Viannia*) mediante PCR del kDNA en garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* recolectadas en los animales silvestres cazados. **2A.** Línea 1, marcador de 50 a 200 pb; línea 2, garrapata 65; línea 3, garrapata 75; línea 4, garrapata 81. **2B.** Línea 1, marcador de 50 a 250 pb; líneas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, garrapatas 1, 2, 3, 65, 4, 5 y 6; línea 9, sin muestra; línea10, LTB-300, control positivo; línea 11, agua, control negativo.



Color	Código	Genotipo	Confianza %
	Muestra 65	*L. guyanensis*	90,2
	Muestra 75	Variación >10 %	
	Muestra 80, control negativo de *Leishmania* sp.	Variación >10 %	
	Muestra 81	Variación >10 %	
	LC 26 (*L. peruviana*)	*L. peruviana*	100
	LC 53 (*L. braziliensis*)	*L. braziliensis*	100
	PH 8 (*L. amazonensis*)	*L. amazonensis*	100
	Lbg (*L. guyanensis*)	*L. guyanensis*	100
	Agua	Agua	100

Figura 3. Análisis mediante HRM-PCR de garrapatas positivas en la PCR del kDNA. En el recuadro se muestra la relación entre el color y la muestra usada en la HRM-PCR. Con una variación mayor de 10 % entre una muestra y el control se descartaba la similitud.
* Muestra positiva

de las cepas de referencia, además de ser negativa en la PCR del kDNA. Por otra parte, todas las restantes garrapatas de las cinco especies del género *Amblyomma* fueron negativas en esta PCR (cuadro 1).

Discusión

Las garrapatas son endémicas en India, Asia, Australia, Madagascar, África, el Caribe, México, Centroamérica y Suramérica (9), y se consideran como el parásito del ganado más importante del mundo, aunque también infectan otros animales domésticos y salvajes (13,14). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se ha reportado como vector de *Babesia bigemina*, *B. bovis* y *Anaplasma marginale* y está presente en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo (15,16), pertenece a la familia Ixodidae, y parasita ovejas y ganado vacuno (16). Tiene una gran capacidad invasiva debido a su gran movilidad para buscar alimento y se distribuye ampliamente en América, África y Oceanía (17). Desde el punto de vista económico, *R. microplus* genera notables pérdidas en la ganadería bovina y ovina debido a la anemia que provoca en los animales por la succión de la sangre y por la trasmisión de agentes patógenos causantes de enfermedades como la babesiosis y la anaplasmosis (18).

En Perú, *R. microplus* se ha reportado como un parásito del ganado y, en Brasil, *R. sanguineus* se considera un parásito de perros, así como potencial vector de *L. infantum* (19-21) y *L. braziliensis* (20). Debe señalarse, además, que en estudios anteriores en Italia y Brasil se encontraron porcentajes más

Cuadro 1. Especies de garrapatas por huésped, sitio de recolección y resultados de la PCR del kDNA

Especies	Número de garrapatas (% en machos)	Huésped	Sitio de recolección	PCR del kDNA Número de muestras positivas (%)
Amblyomma naponense	14 (64)	Tapir	San Lorenzo	0
Amblyomma scalpturatum	18 (67)	Tapir	San Lorenzo	0
Amblyomma oblongoguttatum	3 (0)	Tapir	San Lorenzo	0
Amblyomma latepunctatum	4 (25)	Tapir	San Lorenzo	0
Amblyomma ovale	1 (0)	Tapir	San Lorenzo	0
Rhipicephalus (Boophilus) microplus	41 (44)	Pecarí de collar	Botijón	3 (7)

altos de kDNA (10,2 y 12,3 %, respectivamente) de *L. infantum* en *R. sanguineus* en comparación con los porcentajes encontrados en especies de *Lutzomyia* (<1 %), que son los vectores naturales (2,7).

En el caso de este estudio, el porcentaje de kDNA del parásito fue de 7 % (3/41), lo cual confirma que una gran proporción de garrapatas puede infestarse con *Leishmania* spp. Con la HRM-PCR se pudo identificar la especie patógena *L. guyanensis*. Esta prueba se validó (HRM-PCR *Vs*. secuenciación) en muestras humanas en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto Nacional de Salud de Perú (manuscrito en preparación para publicación).

La PCR del kDNA para detectar *Leishmania* (*Viannia*) spp. y la HRM-PCR para identificar la especie del parásito, se emplearon en el intento de amplificar el citocromo b para su posterior secuenciación, aunque sin éxito. El citocromo b se localiza en el maxicírculo del cinetoplasto con un menor número de copias que el minicírculo, también localizado en este (22,23), y se empleó como sección de molde para la amplificación mediante los dos tipos de PCR. El fallido intento de secuenciación usando el citocromo b se explicaría por el bajo número de parásitos en *R. microplus*. En el caso de las muestras con los códigos 75 y 81, aunque fueron positivas en la PCR del kDNA, presentaron bandas muy tenues, lo cual hace presumir la poca cantidad del genoma presente en el parásito. Por la misma razón, no fue posible identificar la especie de parásito en estas muestras mediante HRM- PCR.

En este estudio las garrapatas infectadas con *Leishmania* spp. eran machos, lo cual coincide con los resultados de un estudio anterior en el que las garrapatas machos se encontraron infestados naturalmente con *L. infantum* en mayor proporción que las hembras. Ello podría explicarse por la necesidad que tienen los machos de moverse con el fin de encontrar pareja y alimento (2).

Este estudio es el primero en detectar e identificar molecularmente la especie *L. guyanensis* en ejemplares de *R. microplus* provenientes de un animal silvestre, el pecarí de collar. Aunque existe la posibilidad de que *R. microplus* pueda haberse contaminado al succionar sangre de otro animal diferente a *P. tajacu*, es de suma importancia investigar su papel como probable huésped o reservorio de *Leishmania*.

Los resultados de esta investigación apoyan la hipótesis de la posible trasmisión de especies patógenas de *Leishmania* al ser humano por la picadura de garrapatas alojadas en mamíferos silvestres de su consumo. Además, es importante señalar el peligro potencial que representa para la salud pública el incremento de la caza de cerdos silvestres y su crianza para alimento humano en granjas.

Futuras investigaciones sobre las garrapatas y su relación con mamíferos silvestres permitirán dar nuevas luces sobre la epidemiología de la leishmaniasis.

Agradecimientos

A Andrés Lescano, Maxy De Los Santos, Jocelyn Pérez y Leonardo Mendoza, por sus recomendaciones e importantes contribuciones.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses con respecto a los contenidos del manuscrito.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Organización Trees de Inglaterra.

Referencias

1. **Dantas-Torres F.** Canine leishmaniosis in South America. Parasit Vectors. 2009;2(Suppl.1):1-8. https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1

2. **Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro A, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, *et al*.** Detection of *Leishmania*

infantum DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. Parasit Vectors. 2012;5:98. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-98

3. **Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chioccola VL.** Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. Parasitol Res. 2011;2:267-74. https://doi.org/10.1007/s00436-010-2247-6

4. **Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D.** Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs, and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. Parasit Vectors. 2011;4:56. https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-56

5. **Dantas-Torres F.** Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. Trends Parasitol. 2011;27:155-9. https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.006

6. **Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa MS, Vissotto de Paiva Diniz PP, de Caprariis D, *et al.*** Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: A longitudinal study. J Clin Microbiol. 2010;48:3316-24. https://doi.org/10.1128/JCM.00379-10

7. **Dantas-Torres F, Testini LV, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, *et al.*** Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. Parasitol Res. 2010;106:857-60. https://doi.org/10.1007/s00436-010-1722-4

8. **Sabogal S.** Filogeografía y conservación genética del pecarí de collar, *Pecari tajacu*, en cuatro departamentos de Colombia (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010.

9. **Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara H.** Carrapatos de Importância Medico-Veterinaria da Região Neotropical: Um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies. 10ma edição. Sao Paulo: Butantan Publicação; 2006. p. 223.

10. **QIAGEN.** Gentra®, Puregene® (QIAGEN Group), 2007-2010. Fecha de consulta: 9 de junio de 2017. Disponible en: https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/gentra-puregene-tissue-kit/#orderinginformation.

11. **López M, Inga R, Cangalaya M, Echevarría J, Llanos-Cuentas A.** Diagnosis the *Leishmania* using the polimerase chain reaction: A simplified procedure for field work. Am J Trop Med Hyg.1993;49:348-56. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.348

12. **Cabrera O, Munstermann L, Cárdenas R, Gutiérrez R, Ferro C.** Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. Biomédica. 2002;22:296-302. https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i3.1167

13. **Labruna M, Romero M, Martins T, Tobler M, Ferrerira F.** Ticks of the genus *Amblyomma* (*Acari: Ixodidae*) infesting tapirs (*Tapirus terrestris*) and peccaries (*Tayassu pecari*) in Perú. Syst Appl Acarol. 2010;15:109-12. https://doi.org/10.11158/saa.15.2.3

14. **Otranto D, Dantas-Torres F.** Canine and feline vector-borne diseases in Italy: Current situation and perspectives. Parasit Vectors. 2010;3:2. https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-2

15. **Rodríguez-Vivas R, Hodgkinson J, Trees A.** Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. Rev Mex Cienc Pecu. 2012;3:9-24.

16. **Chen Z, Liu Q, Liu J, Xu B, Lv S, Xia S, *et al*.** Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. Parasit Vectors. 2014;7:237. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-237

17. **Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R.** New foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. Exp Appl Acarol. 2012;56:385-90. https://doi.org/10.1007/s10493-012-9522-4

18. **Guerrero F, Andreotti R, Bendele K, Cunha R, Miller R, Yeater K, *et al*.** *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. Parasit Vectors. 2014;7:475. https://doi.org/1010.1186/s13071-014-0475-9

19. **Goncalvez L, Filgueira K, Ahid S, Pereira J, Mendes do Vale A, Machado R, *et al.*** Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2014;23:407-12. https://doi.org/10.1590/S1984-29612014071

20. **Silva de Morais R, Goncalves-de-Albuquerquea S, Pessoa e Silva R, Lemos P, Gaudêncio da Silva K, Brandão-Filho S, *et al.*** Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. Vet Parasitol. 2013;196:506-8. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.026

21. **Campos J, Costa F.** Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56:297-300. https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000400005

22. **Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M.** Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. PLoS One. 2014;9:e88845. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088845

23. **Lopes E, Geraldo C, Marcili A, Silva R, Keid L, Oliverira T, *et al*.** Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2016;58:41. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658041

Biomédica 2017;37(Supl.2):215-23
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3382

COMUNICACIÓN BREVE

Especies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) recolectados en reservas naturales de las regiones del Darién y del Pacífico en Colombia

Rafael J. Vivero[1,2], María Angélica Contreras[1,2], Juan D. Suaza[1,2], Iván D. Vélez[1], Charles Porter[2], Sandra I. Uribe[2]

[1] Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Grupo de Investigación en Sistemática Molecular y Biología de Insectos, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

Introducción. Los departamentos de Chocó y Antioquia en Colombia presentan condiciones climáticas y de vegetación que favorecen el establecimiento de especies de vectores del género *Lutzomyia* y la transmisión de *Leishmania* spp. a poblaciones humanas que ingresan a ambientes selváticos conservados.
Objetivo. Reportar las especies de flebotomíneos presentes en tres reservas naturales de las regiones del Darién y del Pacífico en Colombia.
Materiales y métodos. Los flebotomíneos se recolectaron en las reservas naturales El Aguacate (Acandí, Chocó), Nabugá (Bahía Solano, Chocó) y Tulenapa (Carepa, Antioquia). La recolección se hizo con trampas de luz CDC, mediante búsqueda activa en sitios de reposo y con trampas Shannon. La determinación taxonómica de especies se basó en las claves taxonómicas. En algunas especies de interés taxonómico, se evaluó el uso de secuencias parciales de la región 5' del gen *COI*.
Resultados. Se recolectaron 611 flebotomíneos adultos: 531 en Acandí, 45 en Carepa y 35 en Bahía Solano. Se identificaron 17 especies del género *Lutzomyia*, tres del género *Brumptomyia* y una del género *Warileya*. Las distancias genéticas (K2P) y los soportes de agrupación (>99 %) en el dendrograma de *neighbor joining* correspondieron a la mayoría de unidades taxonómicas operacionales moleculares (*Molecular Operational Taxonomic Units*, MOTU) establecidas para el grupo *Aragaoi* y confirmaron claramente la identidad de *Lu. coutinhoi*.
Conclusión. Se identificaron especies que tienen importancia en la transmisión de la leishmaniasis en Acandí, Bahía Solano y Carepa. Se confirmó la presencia de *Lu. coutinhoi* en Colombia.

Palabras clave: Psychodidae; *Leishmania*; reservas naturales, Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3382

Species of sand flies (Diptera: Psychodidae) collected from natural reserves in the Pacific and Darien regions of Colombia

Introduction: The departments of Chocó and Antioquia in Colombia show climatic and vegetation conditions favoring the establishment of vector species of the genus *Lutzomyia* and the transmission of *Leishmania* spp. to human populations entering conserved forest environments.
Objective: To report the species of Phlebotomine sandflies present in three natural reserves in the Darien and Pacific regions of Colombia.
Materials and methods: Sand flies were collected specifically in the natural reserves El Aguacate (Acandí, Chocó), Nabugá (Bahía Solano, Chocó) and Tulenapa (Carepa, Antioquia). Sand flies were collected with CDC light traps, active search in resting places and Shannon traps. The taxonomic determination of species was based on taxonomic keys. For some species of taxonomic interest, we evaluated the partial sequences of the 5' region of *COI* gene.
Results: A total of 611 adult sand flies were collected: 531 in Acandí, 45 in Carepa and 35 in Bahía Solano. Seventeen species of the genus *Lutzomyia*, three of the genus *Brumptomyia* and one of the

Contribución de los autores:
Rafael J. Vivero: diseño del estudio, muestreos en campo, identificación clásica y molecular, análisis de datos y escritura del manuscrito
María Angélica Contreras: identificación molecular
Juan D. Suaza: muestreos en campo y escritura del manuscrito
Iván D. Vélez: diseño del estudio y escritura del manuscrito
Charles Porter: diseño del estudio, identificación clásica y molecular, y escritura del manuscrito
Sandra I Uribe: diseño del estudio, análisis de datos y escritura del manuscrito

genus *Warileya* were identified. The genetic distances (K2P) and grouping supported (>99%) in the neighbor joining dendrogram were consistent for most established molecular operational taxonomic units (MOTU) of the *Aragaoi* group and clearly confirmed the identity of *Lu. coutinhoi.*
Conclusion: Species that have importance in the transmission of leishmaniasis in Acandí, Bahía Solano and Carepa were identified. The presence of *Lu. coutinhoi* was confirmed and consolidated in Colombia.

Key words: Psychodidae; *Leishmania*; natural reservations, Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3382

El conocimiento de la distribución y la presencia de insectos vectores del género *Lutzomyia* es fundamental para alertar sobre el riesgo de transmisión de leishmaniasis en diferentes regiones de Colombia (1,2) cuyas características ecológicas son propicias para el establecimiento de los vectores y de la cadena epidemiológica de la enfermedad (3,4). En este contexto, las poblaciones de insectos vectores de los ecosistemas tropicales son dinámicas tanto en el espacio como en el tiempo (5), aspecto que debe considerarse con especial atención en los estudios ecoepidemiológicos para el diseño de estrategias de prevención y control de las poblaciones del género *Lutzomyia* y de la trasmisión de la enfermedad (6).

El género *Lutzomyia* incluye gran diversidad de especies con características morfológicas particulares cuyo papel en la transmisión es, por lo general, específico de cada especie (4,7), razón por la cual su determinación taxonómica es crucial para entender aspectos biológicos y ecológicos que determinan patrones y dinámicas espacio-temporales de las enfermedades que transmiten (1,8).

Los efectos del cambio climático, la urbanización desorganizada y la expansión de la frontera agrícola han influido de manera considerable en el incremento de los casos de leishmaniasis y en la circulación de diferentes especies del parásito *Leishmania* (*Le. panamensis*, *Le. braziliensis*), por lo cual se hace necesario desarrollar estudios de vigilancia de los reservorios y de los insectos vectores del género *Lutzomyia* (9-13).

En los departamentos de Chocó y Antioquia se ha registrado hasta la fecha, aproximadamente, el 50 % de la fauna de flebotomíneos de Colombia, así como la presencia de un gran número de especies de vectores como *Lutzomyia gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. longipalpis*, *Lu. trapidoi* y *Lu. evansi*, entre otras, que se han encontrado naturalmente infectadas (2,14,15).

Aunque en estos departamentos se han estudiado diversos focos de transmisión de la leishmaniasis (13), es poco el conocimiento existente sobre los insectos de importancia médica en regiones poco exploradas, como los municipios de Bahía Solano (reserva natural Nabugá) y Acandí (Chocó), los cuales tienen una gran actividad ecoturística y de extracción de madera (11). Estos factores constantemente exponen a la población humana al contacto con los vectores y a la subsecuente infección por *Leishmania* spp. (1). Otras áreas boscosas protegidas, como la reserva natural Tulenapa, que alberga el Centro de Desarrollo Tecnológico del Darién, ubicadas en el municipio de Carepa en Antioquia, también son de relevancia para el desarrollo de estudios biológicos de insectos vectores de leishmaniasis.

En este contexto, en el presente estudio se presenta un reporte taxonómico de flebotomíneos y especies de importancia médica presentes en tres reservas naturales de los municipios de Bahía Solano y Acandí en el Chocó, y de Carepa en Antioquia.

Materiales y métodos

Área de estudio

Los muestreos entomológicos se hicieron en tres áreas de bosque conservado. La primera fue la reserva natural El Aguacate, municipio de Acandí (8°36'56,33" N, 77°19'44,69" O), en la costa Caribe del Darién chocoano (figura 1). Esta región corresponde a una zona de bosque húmedo tropical (16). Los registros mensuales de temperatura arrojan un promedio anual de 28 °C, presentándose una pequeña disminución entre los meses de enero y abril. La reserva tiene una cobertura de 200 hectáreas con fragmentos de bosque que contienen una gran diversidad de especies. Las viviendas de los colonos están construidas básicamente con madera y están separadas unas de otras por

Correspondencia:
Rafael J. Vivero Gómez, Calle 62 N° 52 - 59, laboratorio 632, Medellín, Colombia
Teléfonos: (574) 219 6502 y (300) 678 6498
rjviverog@unal.edu.co

Recibido: 18/07/17; aceptado: 12/09/17

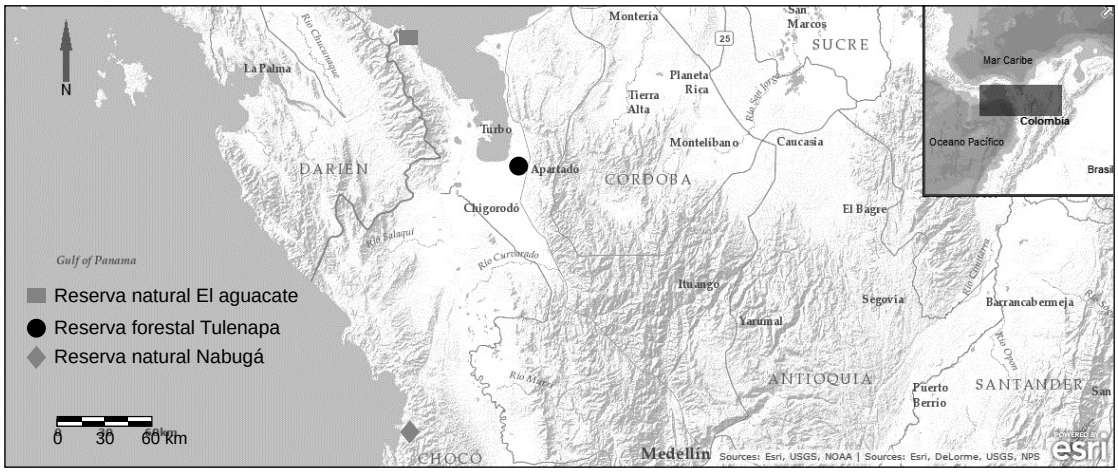


Figura 1. Localización geográfica de las áreas de estudio en los departamentos de Antioquia y Chocó.
Fuente del mapa: elaborado por ESRI, *U.S. Geological Survey*, USGS, *National Oceanic and Atmospheric Administration*, NOAA

parches forestales o cultivos de iraca que fragmentan el ambiente silvestre. La población estimada es de 100 habitantes.

La segunda zona de estudio correspondió al área conocida como reserva natural Nabugá (6°21'26, 16" N, 77°21'46,45" O), ubicada al noroccidente de Colombia, en el océano Pacífico norte, específicamente en Bahía Solano (Chocó) (figura 1). La zona está a 45 minutos de Bahía Solano, es estrictamente selvática y tiene una gran riqueza de fauna y flora, con un bajo grado de intervención o perturbación de las especies nativas vegetales. La temperatura promedio en Nabugá es de 26 °C y la humedad relativa es de 91 % (16).

Entre las actividades económicas de estas dos primeras áreas de estudio, se destaca el turismo ecológico, la agricultura y la ganadería en menor escala, así como la pesca deportiva y artesanal.

La tercera área de estudio está ubicada en el municipio de Carepa (Antioquia) y es conocida como la reserva forestal Tulenapa (7°45'42,10" N, 76°39'22,57" O), la cual es una sede natural de estudios biológicos y alberga el Centro de Desarrollo Tecnológico del Darién de la Universidad de Antioquia (figura 1), con una extensión protegida de 193 hectáreas de bosque virgen no intervenido. Tulenapa es un área semiprotegida, de importancia para la vida silvestre, y presenta rasgos geológicos de especial interés para fines de conservación. La zona, localizada en la subregión del Urabá antioqueño, registra una temperatura promedio de 25 °C y su humedad relativa es de 93 % (17). La principal actividad económica de la región es la explotación intensiva de banano.

Recolección, procesamiento e identificación de flebotomíneos

Los muestreos entomológicos se hicieron durante tres días consecutivos. En Bahía Solano, se efectuaron entre el 5 y el 8 de mayo del 2012; en Acandí, entre el 2 y el 5 de noviembre de 2011, y en Carepa, del 3 al 6 de febrero de 2013.

Para la recolección se emplearon ocho trampas de luz CDC, activadas entre las 17:00 y las 06:00 h (18). También, se hizo búsqueda activa entre las 05:00 y las 10:00 horas con aspirador bucal para la recolección de adultos en reposo sobre raíces tabulares de árboles (18). También, se hizo recolección activa con trampas de luz Shannon durante tres horas en la noche (18).

Los flebotomíneos recolectados se conservaron a -20 °C en viales de 1,5 ml debidamente codificados. Los individuos fueron procesados siguiendo el protocolo de montaje y aclaración propuesto por Young, *et al.* (19), en el cual se sumergen las estructuras de los adultos en una solución de lactofenol (proporción 1:1 de ácido láctico y fenol) durante 24 horas. En los montajes permanentes se empleó bálsamo de Canadá y, en los semipermanentes, láminas cóncavas con solución de lactofenol.

La determinación taxonómica de especies se basó en claves taxonómicas generadas a partir de los caracteres morfológicos del estado adulto (19-21). La recolección de los especímenes adultos se conservó en láminas portaobjetos y en alcohol etílico al 70 %, y se mantiene en la Unidad de Entomología Médica del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET,

de la Universidad de Antioquia. Se consultaron los estudios actuales sobre registros y distribución geográfica de flebotomíneos en los dos departamentos y en Colombia (2,14,15,22,23). Por último, se calculó el número absoluto y el porcentaje de individuos para cada especie, según el método de recolección y la localidad de muestreo.

Análisis genético de secuencias parciales del gen citocromo oxidasa I

Es necesario indicar que la extracción de ADN y los ensayos moleculares se hicieron exclusivamente para la verificación taxonómica de ejemplares adultos de *Lu. coutinhoi*, con la finalidad de confirmar su presencia en Colombia mediante un método complementario al análisis de caracteres morfológicos. El ADN se extrajo del tórax y los segmentos proximales del abdomen utilizando el protocolo de alta concentración de sales (24). El fragmento 5' del gen mitocondrial *COI* se amplificó con los iniciadores LCO1490 GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG y HCO2198–TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA, en las condiciones de reacción y con el perfil térmico previamente descritos (25). Los productos obtenidos se secuenciaron en ambos sentidos de la cadena de ADN.

Se estimó la variabilidad genética (sitios variables y distancias genéticas K2P) entre las secuencias del *COI* obtenidas de *Lu. coutinhoi* y las de otras especies del grupo *Aragaoi*. Se generó un dendrograma de distancias K2P con el método *neighbor joining* (NJ) para representar de forma gráfica el patrón de agrupamiento entre las distintas secuencias (26).

Lutzomyia coutinhoi presenta leves variaciones morfológicas en el aparato reproductor (*genitalia*) de los machos y gran similitud morfológica en el de las hembras, con respecto a otras especies del grupo *Aragaoi.* Aunque las claves actualizadas de Galati (21) permiten la diferenciación de estas especies, las cuales contemplan mediciones como la de los antenómeros, algunos caracteres, como la forma y la pigmentación del falo (*aedeagus*), la forma final de los filamentos genitales y la presencia de tufo de setas, son subjetivos.

Resultados

Se recolectaron 616 flebotomíneos adultos, la mayoría de ellos con las trampas CDC (n=585; 94,9 %), en tanto que, mediante búsqueda activa (n=10; 1,62 %) y con las trampas Shannon (n=16; 2,5 %), se recolectaron menos ejemplares (cuadro 1).

Se identificaron 21 especies distribuidas en los géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* (cuadro 1). El mayor número de especies se registró en la reserva natural El Aguacate. La especie más frecuente en esta reserva fue *Lu. carpenteri* (n=244; 45,9 %), en tanto que en las reservas naturales de Tulenapa y Nabugá, las más frecuentes fueron *Lu. serrana* (n=20; 44,4 %) y *Lu. reburra* (n=14; 40 %), respectivamente (cuadro 1).

En el registro de flebotomíneos obtenido en la reserva natural Nabugá (Bahía Solano), se destacó la especie *Lu. coutinhoi* (figura 2), hallazgo que permitió confirmar su presencia en Colombia (cuadro 1). Para consolidar este hallazgo, se analizaron los patrones morfológicos exhibidos principalmente por los machos y, para su confirmación taxonómica, se utilizaron secuencias parciales del marcador mitocondrial, el gen citocromo oxidasa I (*COI*), tanto en machos como en hembras. Previamente, Contreras, *et al.* (2), habían reportado las secuencias de nucleótidos del gen *COI*, pero no hicieron un análisis minucioso que validara la identidad de la especie y confirmara su presencia en Colombia.

El análisis genético de un fragmento de 527 nucleótidos del gen *COI* reveló 85 sitios variables de nucleótidos y 59 de aminoácidos en *Lu. coutinhoi* y *Lu. aragaoi* (figura 3a), consideradas las especies más cercanas y las que guardan mayor similitud morfológica. El número de sitios se mantuvo en el rango de variabilidad de nucleótidos de las otras especies del grupo *Aragaoi* contempladas en el estudio (*Lu. carpenteri*, *Lu. runoides*, *Lu. aragaoi*, *Lu. shannoni* y *Lu. aclydifera*).

Las distancias genéticas K2P entre *Lu. coutinhoi* y *Lu. aragaoi* fluctuaron entre 0,175 y 0,180, lo cual concuerda con el rango de distancias entre especies dentro del grupo *Aragaoi* (K2P: 0,128 a 0,183). El dendrograma de NJ fue consistente y se respaldó utilizando el método de remuestreo *bootstrap* (>99 %), y reflejó de manera clara la agrupación de secuencias del *COI* de *Lu. coutinhoi* con respecto a las demás especies (figura 3b).

Discusión

El inventario taxonómico de flebotomíneos de este estudio incluye un gran número de especies del género *Lutzomyia* de importancia en la transmisión de la leishmaniasis (*Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. hartmani*) (1), especialmente en ambientes rurales cercanos a reservas forestales asociadas con ecosistemas de bosque húmedo tropical (27-29). Entre los hallazgos más

Cuadro 1. Especies de los géneros *Brumptomyia*, *Lutzomyia* y *Warileya* recolectadas en las reservas naturales El Aguacate, Nabugá y Tulenapa, Colombia

Departamento	**Departamento del Chocó**				**Departamento de Antioquia**						
Reserva natural	**Nabugá, Bahía Solano**				**El Aguacate, Acandí**		**Tulenapa, Carepa**				
Región	**Pacífico**				**Darién Caribe**		**Urabá**				
Método de recolección	**Búsqueda activa**		**Trampa CDC**		**Trampa CDC**		**Trampa CDC**		**Trampa Shannon**		**Total por especie (%)**
Especie	**Hembra**	**Macho**	**Hembra**	**Macho**	**Hembra**	**Macho**	**Hembra**	**Macho**	**Hembra**	**Macho**	
Lu. carpenteri	-	-	-	-	74	164	2	4	-	-	244 (39,6)
Lu. trapidoi+	-	1	1	-	45	89	2	1	-	-	139 (22,6)
Lu. camposi	-	-	-	-	39	9	3	1	1	-	53 (8,6)
Lu. hartmani+	-	-	-	-	1	38	-	-	-	-	39 (6,3)
Lu. gomezi+	-	-	3	-	13	13	-	-	-	-	29 (4,7)
Lu. panamensis+	-	-	-	-	14	-	-	-	9	2	25 (4,1)
Lu. serrana	-	-	-	-	-	-	10	6	2	2	20 (3,2)
Lu. sanguinaria+	-	-	-	-	9	10	-	-	-	-	19 (3,1)
Lu. reburra	-	-	7	7	-	-	-	-	-	-	14 (2,3)
Lu. trinidadensis+	4	4	-	-	2	-	-	-	1	-	11 (1,8)
Lu. barretoimajuscula	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	6 (1)
Lu. vespertilionis	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5 (0,8)
Lu. coutinhoi	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	3 (0,5)
Lu. aclydifera	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1 (0,2)
Lu. atroclavata+	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (0,2)
Lu. shannoni+	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (0,2)
Lu. triramula	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,2)
Br. hamata	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2 (0,3)
Br. mesai	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1 (0,2)
Br. leopoldoi	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,2)
Wa. nigrosaculus	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,2)
Total por sexo	4	6	14	15	205	326	17	12	12	4	616
Total por trampa (%)	10		25		531		29		16		

+ Vector comprobado o sospechoso de *Leishmania* spp. en América (según Bates,*et al.* (1); Maroli, *et al*. (5))

importantes se destaca, asimismo, la confirmación taxonómica de *Lu. coutinhoi* para Colombia. Por otra parte, la presencia de los géneros *Warileya* y *Brumptomyia,* frecuentemente asociados con una perturbación ambiental reducida, resulta útil para emplearlos como bioindicadores del estado natural de los ecosistemas (14,30,31).

Este es el primer reporte exploratorio de flebotomíneos en la reserva natural y estación experimental Tulenapa, el cual abre la posibilidad de hacer futuros estudios biológicos más sistémicos y con mayor esfuerzo de muestreo. Todas las especies recolectadas ya han sido registradas para el departamento de Antioquia (2), y solo *Lu. panamensis* y *Lu. trinidadensis* revisten importancia médica (1,32).

La fauna de flebotomíneos recolectada en la reserva El Aguacate en Acandí no evidenció diferencias sustanciales en cuanto a la riqueza de especies con respecto a estudios anteriores en la misma localidad (15). Sin embargo, sí hubo diferencias con respecto a la abundancia, pues fue menor la de *Lu. panamensis* y mayor la de *Lu. trapidoi*, lo cual sugiere una alternancia estacional (abril *Vs*. noviembre) asociada con las épocas de recolección y con el efecto de las variables climáticas en las poblaciones de estos insectos vectores (33,34).

Este hallazgo sugiere que *Lu. trapidoi* puede pasar de ser un vector secundario a ser vector primario en ausencia de *Lu. panamensis*, lo cual es de importancia en salud pública porque la superposición de especies de vectores y la alternancia estacional implican una mayor complejidad en los ciclos de transmisión de la leishmaniasis (35). En este sentido, es necesario precisar que *Lu. trapidoi* es vector de *Leishmania braziliensis*, *L. panamensis* y *L.mexicana* en la región del Pácifico y en el valle del río Cauca, principalmente, mientras que *Lu. panamensis* es vector de *L. braziliensis* y *L. panamensis* en el valle del río Magdalena y la región del Darién (1,11). Lo anterior amerita la realización de estudios sobre la infección natural en las poblaciones de *Lu. trapidoi* en el municipio de Acandí, para validar su estatus de vector en la región de Urabá en Colombia.

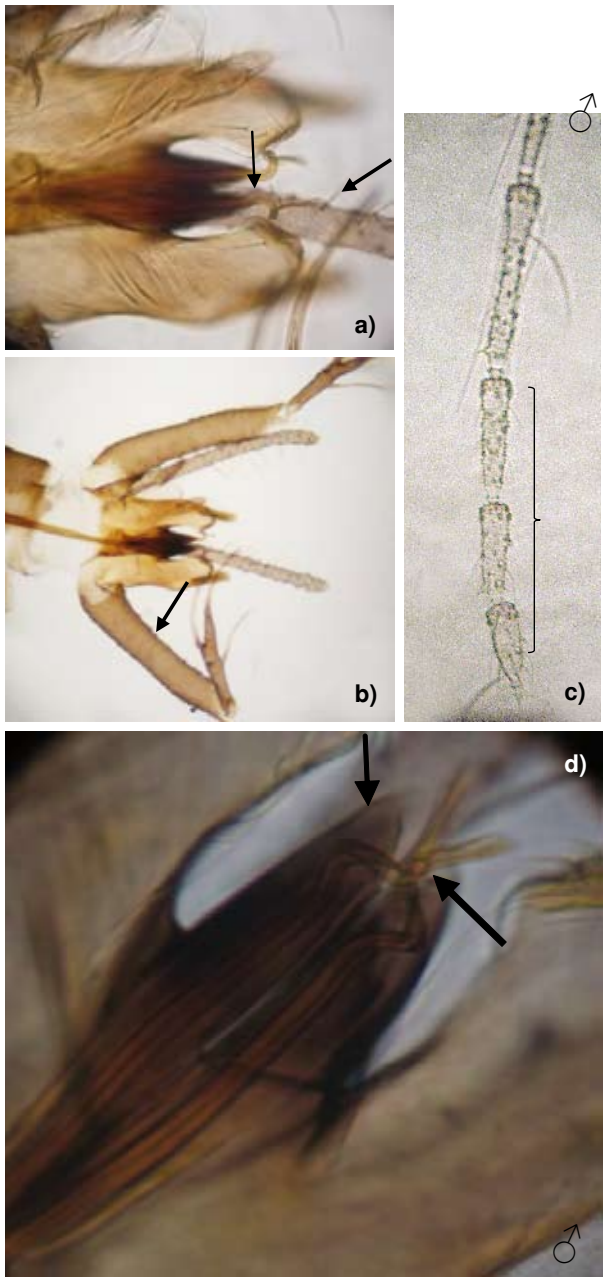


Figura 2. Estructuras morfológicas de interés (señaladas con flechas) del aparato reproductor (genitalia) externo e internao de machos de *Lutzomyia coutinhoi* (Mangabeira, 1942) y *Lu. aragaoi* Costa Lima 1932. *Lu. coutinhoi*: **a)** falo (*aedeagus*) y terminación en forma de espiral de filamentos genitales; **b)** ausencia de tufos distales en el gonocoxito; *Lutzomyia aragaoi*; **c)** ausencia de ascoides en los tres últimos flagelómeros; **d)** señalización de la forma del falo (*aedeagus*) y terminación de filamentos genitales (Microscopio Motic-40X/0,65).

En la reserva de Nabugá (Bahía Solano) también se recolectaron varias especies de importancia en la transmisión de *Leishmania* (*Lu. trapidoi*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. gomezi*) (1), pero uno de los principales hallazgos fue la recolección de ejemplares de *Lu. coutinhoi*, como confirmación de su presencia en Colombia.

Lutzomyia coutinhoi se había registrado únicamente en Brasil, Bolivia y Perú (19), y es una especie sin importancia epidemiológica. Las especies del grupo *Aragaoi* provenientes de diferentes localidades pueden presentar considerables variaciones en la forma, la longitud y la pigmentación de sus parámeros y del falo (*aedeagus*) (19,21). Sin embargo, presenta claramente un parámero y un falo (*aedeagus*) alargados (este último relativamente más delgado), con filamentos genitales que se diferencian claramente en cuanto a la forma en que va el espiral (figura 2a) de especies del mismo grupo, como *Lu. aragaoi* (figura 2d). Galati (21) ubica esta especie en el género *Psathyromyia*, y sugiere la ausencia de tufo de setas distales en el gonocoxito (figura 2b) y el falo (*aedeagus*) en forma de cono, como caracteres diagnósticos en los machos. En las hembras, la longitud del flagelómero III (210 µm) es menor que en *Lu. aragaoi* (320 µm) (19,21). Otro rasgo distintivo es la ausencia de ascoides en los tres últimos flagelómeros, lo cual constituye uno de los caracteres diagnósticos de *Lu. coutinhoi* (21) (figura 2c).

El análisis genético complementario de las secuencias del *COI* fue más exhaustivo en este estudio, y permitió consolidar la identificación de *Lu. coutinhoi* y la agrupación de sus secuencias (dendrograma NJ, figura 3b) frente al resto de especies del grupo *Aragaoi*, como *Lu. aragaoi*, *Lu. carpenteri*, *Lu. runoides*, *Lu. shannoni* y *Lu. aclydifera* (figura 3b). Las distancias K2P entre especies concordaron con lo propuesto en diversos estudios para la diferenciación de especies de *Lutzomyia* (36), e indica un significativo polimorfismo de nucleótidos entre *Lu. coutinhoi* y *Lu. aragaoi* (figura 3a), especies estrechamente relacionadas. Es necesario hacer énfasis en que tres de las secuencias registradas en GenBank como *Lu. aragaoi* por Contreras, *et al.* (2), corresponden en realidad a *Lu. coutinhoi.*

En conclusión, el análisis integrador de los caracteres morfológicos y moleculares es indispensable para un registro más preciso de los inventarios de flebotomíneos (37), ya que las hembras de algunas especies carecen de caracteres morfológicos distintivos (38). Asimismo, es necesario llevar a cabo curadurías sistemáticas de las secuencias registradas en GenBank, sobre todo cuando provienen de áreas geográficas cuya diversidad es poco conocida.

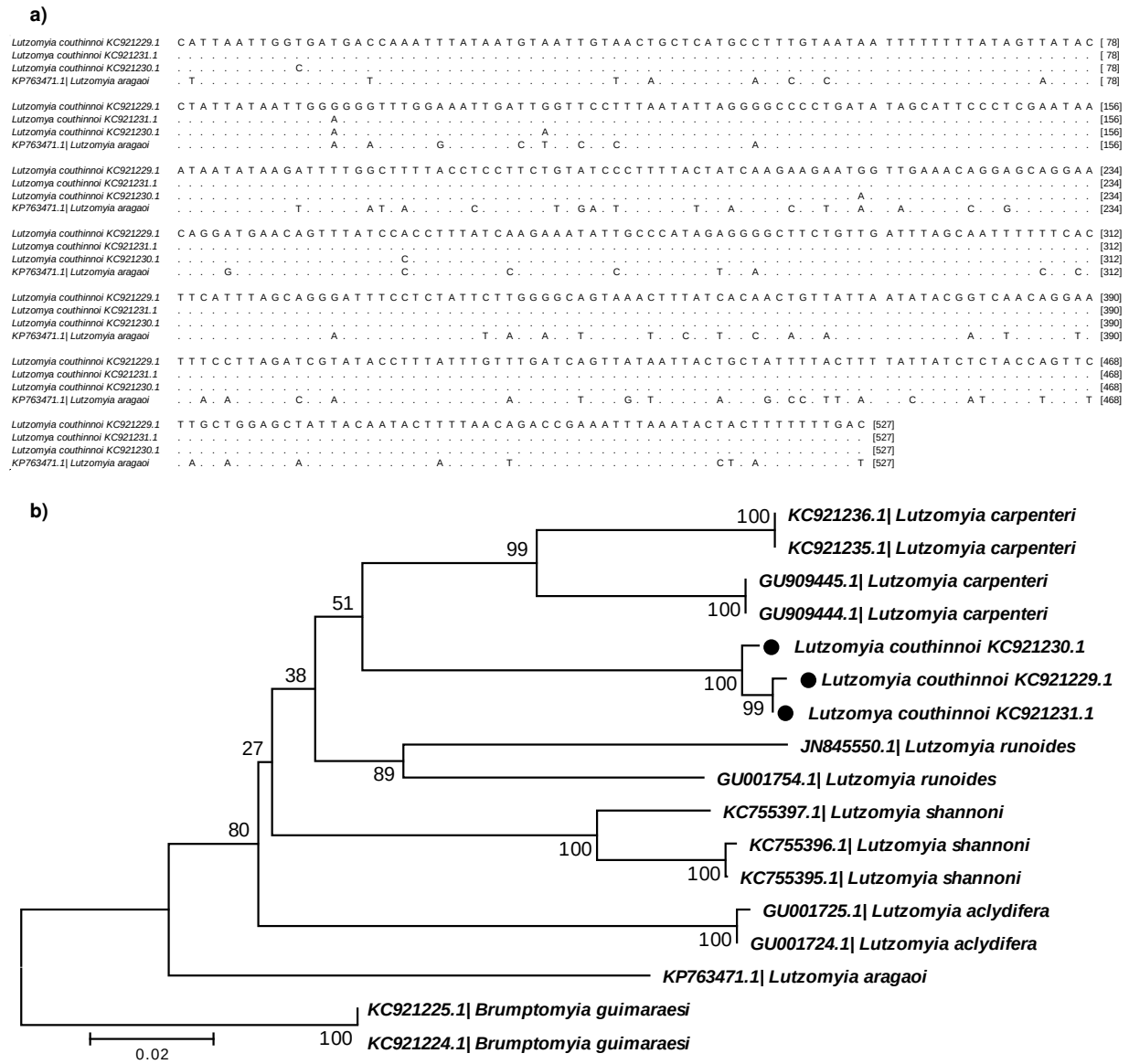


Figura 3. Confirmación taxonómica de *Lutzomyia coutinhoi* (Mangabeira, 1942) mediante el análisis de secuencias del gen *COI*. **a)** Secuencias parciales del gen *COI* de *Lutzomyia coutinhoi Vs. Lutzomyia aragaoi;* **b)** dendrograma de NJ con la agrupación de secuencias de *Lutzomyia coutinhoi* con respeto a especies hermanas del grupo *Aragaoi*

Se espera que este trabajo sea útil para los estudios epidemiológicos y que funcione como base para futuras investigaciones taxonómicas de especies del género *Lutzomyia* presentes en los municipios de Carepa, Acandí y Bahía Solano. Se sugiere, además, estudiar el estatus de infección natural por *Leishmania* spp. en las especies de *Lutzomyia* de importancia médica y en los reservorios silvestres de cada localidad.

El gran número de especies de vectores de leishmaniasis cutánea representa un factor de riesgo para la población humana que interactúa de forma constante o esporádica con estos ambientes selváticos en los municipios de Acandí, Carepa y Bahía Solano.

Agradecimientos

A Jovany Barajas (PECET, Universidad de Antioquia), por su ayuda en la recolección de flebotomíneos en la reserva Nabugá, Bahía Solano. A los pobladores locales que permitieron y facilitaron las visitas de campo para la recolección de los flebotomíneos.

Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses.

Financiación

Grupo de Investigación en Sistemática Molecular y Biología de Insectos, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín.

Referencias

1. **Bates PA, Depaquit J, Galati EA, Kamhawi S, Maroli M, Mcdowell MA, *et al*.** Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. Parasit Vectors. 2015;8:131. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0712-x
2. **Contreras-Gutiérrez MA, Vélez ID, Porter CH, Uribe SI.** Lista actualizada de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) de la región cafetera colombiana. Biomédica. 2014;34:483-98. https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.2121
3. **Dantas-Torres F, Tarallo VD, Latrofa MS, Falchi A, Lia RP, Otranto D.** Ecology of phlebotomine sand flies and *Leishmania infantum* infection in a rural area of southern Italy. Acta Trop. 2014;137:67-73. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.034
4. **Sharma U, Singh S.** Insect vectors of *Leishmania*: Distribuition, physiology and their control. J Vector Borne Dis. 2008;45:255-72.
5. **Maroli M, Khoury C.** Current approaches to the prevention and control of leishmaniasis vectors. Vet Res Commun. 2006;30:49-52.
6. **Nieves E, Oraá L, Rondón Y, Sánchez M, Sánchez Y, Rujano M, *et al*.** Distribution of vector sandflies leishmaniasis from an endemic area of Venezuela. J Trop Dis Public Health. 2015;3. https://doi.org/10.4172/2329-891X.1000157
7. **Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, *et al*.** Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e638. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000638
8. **Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID.** Novedades en la distribución geográfica del grupo verrucarum (Diptera : Psychodidae) en Colombia. Biomédica. 2003;23:341-50. https://doi.org/10.7705/biomedica.v23i3.1228
9. **Armed Forces Pest Management Board.** Sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): Significance, surveillance, and control in contingency operations. Armed Forces Pest Manag Board. 2015;49:72.
10. **Instituto Nacional de Salud.** Semana epidemiológica número 45. Bogotá: INS; 2015. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx.
11. **Duque P, Vélez I, Morales M, Sierra D.** Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in Afro-Colombian and Amerindian communities of Chocó, Pacific Coast of Colombia. Neotrop Entomol. 2004;33:255-64. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000200018
12. **Ovalle CE, Porras L, Rey M, Ríos M, Camargo YC.** Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. Biomédica. 2006;26:145-51. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1508
13. **Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Paláu MT, Cáceres E, *et al.*** Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1990;42:206-14. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.206
14. **Vivero RJ, Muskus CE, Uribe SI, Bejarano EE, Torres C.** Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en la reserva natural del cañón del río Claro (Antioquia), Colombia. Actual Biol. 2010;32:165-71.
15. **Vivero R, Muskus C, Torres C.** Fauna of Phlebotominae (Diptera : Psychodidae) in Acandí (Chocó, Colombia). Acta Biol Colomb. 2011;16:209-17.
16. **Rangel O, Arellano P.** Clima del Chocó biogeográfico/Costa Pacífica de Colombia. En: Rangel O, editor. Diversidad Biótica IV. Bogotá: Universidad Nacional; 2004. p. 39-82.
17. **Espinal LS.** Geografía ecológica del departamento de Antioquia (zonas de vida (formaciones vegetales) del departamento de Antioquia). Fac Nac Agron. 1964;24:24-32.
18. **Alexander B.** Sampling methods for phlebotomine sand flies. Med Vet Entomol. 2000;14:109-22. https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00237.x
19. **Young DG, Duncan M.** Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). J Biol Sci. 1994;14:79-94.
20. **Ibáñez-Bernal S.** Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia*, França. Folia Entomol Mex. 2005;44:195-212.
21. **Galati EA.** Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, morfologia, terminologia e identificação de adulto. En: Rangel EF, Lainson R, editor. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2016. p. 367.
22. **Bejarano EE, Uribe SI, Pérez-Doria A, Egurrola J, Dib JC, Porter CH.** New records of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) at Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. Acta Biol Colomb. 2015;20:221-4.
23. **Estrada LG, Aponte OA, Bejarano EE.** New records of species of *Lutzomyia* (Diptera : Psychodidae) from the department of Cesar, Colombia. Acta Biol Colomb. 2015;20:225-8.
24. **Vivero RJ, Contreras-Gutiérrez MA, Bejarano EE.** Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. Biomédica. 2007;27:429-38. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i3.205
25. **Hebert P, Cywinska A, Ball S, DeWaard J.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 2003;270:313-21. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218
26. **Hajibabaei M, Singer GA, Hebert PD, Hickey DA.** DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends Genet. 2007;23:167-72. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001
27. **Dutari LC, Loaiza JR.** American cutaneous leishmaniasis in Panamá: A historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. Parasit Vectors. 2014;7:218. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-218.

28. **Le Ponti F, León R, Guerrini F, Gantier JC, Mouchet J, Echeverría R, *et al*.** Leishmaniasis in Ecuador: *Lutzomyia trapidoi*, vector of *Leishmania panamensis*. Ann Soc Belg Med Trop. 1994;74:23-8.

29. **Saldaña A, Chaves LF, Rigg CA, Wald C, Smucker JE, Calzada JE.** Clinical cutaneous leishmaniasis rates are associated with household *Lutzomyia gomezi*, *Lu. panamensis*, *and Lu. trapidoi* abundance in Trinidad de Las Minas, Western Panamá. Am J Trop Med Hyg. 2013;88: 572-4. https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0579

30. **Barreto M, Burbano ME.** New geographic records of *Warileya* and *Brumptomyia* (Diptera : Psychodidae) in South Western Colombia. Acta Biol Col. 2007;12:143-8.

31. **Vivero RJ, Bejarano EE, Castro M, Vélez A, Pérez JE, Pérez-Doria A, *et al.*** Trece registros nuevos de *Lutzomyia* (Diptera : Psychodidae) para el departamento de Vichada, Orinoquia colombiana. Biota Neotrop. 2010;10:401-4.

32. **Salomon O.** Vectores de leishmaniasis en Las Américas. Gazeta Médica da Bahia. 2009;79:3-15.

33. **Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, *et al.*** Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi.* Acta Trop. 2003;85:19-29. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00189-4

34. **Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF.** Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:759-65. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000600001

35. **Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C.** Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. PLoS One. 2015;10:1-16.

36. **Gutiérrez MA, Vivero RJ, Vélez ID, Porter CH, Uribe S.** DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. PLoS One. 2014;9:e85496. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085496

37. **Island C, Azpurua J, Cruz DD, Valderrama A, Windsor D.** *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panamá. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e627. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000627

38. **Kuwahara K, Kato H, Gómez EA, Uezato H, Mimori T, Yamamoto Y, *et al*.** Genetic diversity of ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences in *Lutzomyia* species from areas endemic for New World cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 2009;112:131-6. https://doi.org/10. 1016/j.actatropica.2009.07.010

Biomédica 2017;37(Supl.2):224-43
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3475

REVISIÓN DE TEMA

Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades

Sergio Andrade-Ochoa[1], Luvia E. Sánchez-Torres[1], Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón[2], Alejandro D. Camacho[1], Benjamín Nogueda-Torres[1]

[1] Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México
[2] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México

Más de la mitad de la población humana está expuesta a contraer infecciones transmitidas por mosquitos. El cambio climático y la aparición de cepas resistentes a los insecticidas tradicionalmente utilizados han motivado la búsqueda de nuevos agentes capaces de controlar las poblaciones de mosquitos. Los aceites esenciales han resultado ser eficaces agentes repelentes y larvicidas.
El objetivo de este trabajo fue revisar las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años sobre la actividad larvicida de los aceites esenciales y sus componentes contra mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, así como los últimos reportes sobre su posible mecanismo de acción.

Palabras clave: aceites volátiles; insectos vectores; vectores de enfermedades; larvicidas; terpenos.
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3475

Essential oils and their components as an alternative in the control of mosquito vectors of disease

More than half of the human population is exposed to mosquito-borne infections. Climate change and the emergence of strains resistant to traditionally used insecticides have motivated the search of new agents for mosquito population control. Essential oils have been effective repellents and larvicidal agents.
The aim of this work was to review research studies conducted in recent years on the larvicidal activity of essential oils and their components against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* mosquitoes, as well as the latest reports about their possible mechanism of action.

Key words: Oils, volatile; insect vectors; disease vectors; larvicides; terpenes.
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3475

Más de la mitad de la población humana está expuesta a contraer infecciones transmitidas por mosquitos. La falta de tratamientos y vacunas eficaces para muchas de estas enfermedades hace que su control dependa principalmente de la utilización de agentes insecticidas (1). Los individuos que habitan en las áreas tropicales están más expuestos a contraer enfermedades transmitidas por vectores y este riesgo ha aumentado en otras zonas debido a la globalización (2).

Culex, *Aedes* y *Anopheles* son vectores de diversas enfermedades, como la filariasis, el dengue, la malaria, y otras. *Culex quinquefasciatus* está presente en vastas regiones tropicales del mundo, es la principal plaga doméstica en muchas áreas urbanas y está implicada en la transmisión de muchos agentes patógenos, entre ellos, el causante de la filariasis linfática. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en las zonas tropicales, con alrededor de 120 millones de personas infectadas en todo el mundo (3).

Correspondencia:
Sergio Andrade-Ochoa, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Colonia Santo Tomás 11340, Ciudad de México, México
Teléfono: (52) (614) 182 1518
s.andrade.rat@gmail.com

Recibido: 30/08/16; aceptado: 27/04/17

Contribución de los autores:
Alejandro D. Camacho: diseño del trabajo, revisión sistematica de la actividad biológica de los aceites esenciales y revisión del manuscrito
Benjamín Nogueda-Torres: diseño del trabajo, revisión sistemática de la actividad de los componentes
Alejandro D. Camacho: revisión sistematica de la actividad biológica de los aceites esenciales y revisión del manuscrito
Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón: revisión sistematica de la actividad biológica de los aceites esenciales, revisión de los estudios de simulación computacional y modelado molecular de los sesquiterpenos y dianas biológicas, y revisión del manuscrito
Luvia E. Sánchez-Torres: revisión sistemática de la actividad de los componentes y escritura del manuscrito
Sergio Andrade-Ochoa participó en todas las étapas del estudio.

Aedes aegypti es el principal vector del dengue clásico y el dengue hemorrágico. La incidencia del dengue ha aumentado 30 veces en las últimas décadas y cerca de dos quintas partes de la población mundial está ahora en riesgo (4). Se estima que unos 2,5 millones de personas viven en más de 100 países endémicos y que 50 millones de infecciones se producen anualmente (5). Los mosquitos del género *Aedes* también pueden transmitir otros virus, como el del Nilo Occidental, del cual ya se han reportado varios casos de infección en el continente americano (6), así como la fiebre de chikungunya, producida por un alfavirus en expansión geográfica (7,8) y la enfermedad causada por el virus Zika, el cual es un flavivirus que se transmite tanto en áreas urbanas como selváticas.

La malaria, o paludismo, es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* que se transmiten a las personas por la picadura del mosquito *Anopheles*. Según las últimas estimaciones, 198 millones de casos de malaria se produjeron a nivel mundial en el 2013 y la enfermedad dio lugar a 584.000 muertes (9). Béguin, *et al*., han pronosticado que más de 200 millones de individuos estarán en riesgo para el 2050 debido al acelerado cambio climático y la lentitud en el desarrollo socioeconómico de los países del tercer mundo (10), los cuales se ubican principalmente en las zonas endémicas, por lo que es claro que las actividades del hombre y las alteraciones en la biodiversidad de los ecosistemas afectan de manera significativa el número y el movimiento de las especies de reservorios y vectores, y, en consecuencia, la incidencia de las enfermedades transmitidas por vectores en humanos (11).

Es evidente que el cambio climático representa un grave problema al aumentar los rangos geográficos de riesgo de las enfermedades transmitidas por vectores. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que, si las temperaturas globales se incrementan de 2 a 3 °C para el 2030, como se espera, la población en riesgo de infectarse con malaria, por ejemplo, aumentará de 3 a 5 % (12). Por otro lado, el uso intensivo de insecticidas sintéticos en el control de los mosquitos ha generado muchos problemas y ha tenido un impacto negativo en el medio ambiente, así como resistencia (13), con efectos indeseables sobre organismos no específicos y sobre la vida silvestre (14,15).

La resistencia de los mosquitos a los insecticidas se ha reportado en todo el mundo, como puede comprobarse por los hallazgos en Tanzania (16), Grecia (17), México (18), Tailandia (19) y Colombia (20), por mencionar solo algunos países. Debido a la alta incidencia de cepas resistentes a los insecticidas tradicionalmente utilizados, hoy se buscan nuevos métodos para el control de los mosquitos. Los productos naturales de origen vegetal con actividad insecticida potencial, se consideran alternativas válidas frente a los pesticidas sintéticos convencionales en el control de una amplia variedad de insectos, plagas y vectores.

A lo largo de la historia, las plantas y los insectos han coexistido y evolucionado en paralelo. Las plantas han aprovechado a los insectos como agentes polinizadores, pero también han tenido que desarrollar mecanismos de defensa contra insectos depredadores (21). En este contexto, los aceites esenciales y sus componentes se destacan como compuestos potencialmente útiles contra los insectos (22,23).

Aceites esenciales y su composición química

Los aceites esenciales son sustancias de origen vegetal cuyas mezclas de metabolitos secundarios volátiles, insolubles en agua, les confieren características particulares según sus diferentes proporciones (24). Estos aceites se originan en los tejidos secretores de las plantas y, por lo general, son líquidos a temperatura ambiente, más ligeros que el agua, de olor fuerte y penetrante que recuerda su planta de origen, e incoloros o de color amarillo traslúcido (25).

Su función es variada en las plantas: son agentes de polinización y sirven de reserva y de protección, ya que defienden a la planta de otras plantas, de algunos insectos y de microorganismos. Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: su consistencia, su origen y la composición química de sus componentes mayoritarios (26).

En cuanto a su composición química, se encuentran principalmente terpenos y fenilpropanos, a partir de los cuales se pueden constituir aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas, entre otros. Estos compuestos son los responsables de la fragancia y las propiedades biológicas de los aceites esenciales. Es importante resaltar que 85 % de estos aceites suele tener uno o dos compuestos mayoritarios, mientras que el resto de su composición consiste en decenas de compuestos minoritarios (24,25).

Los aceites esenciales se han estudiado ante todo como agentes antimicrobianos. El de orégano, por ejemplo, se ha analizado ampliamente por su

actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (27), así como contra hongos filamentosos, levaduras y protozoarios (28,29).

Como ya se mencionó, los aceites esenciales pueden ser una fuente alternativa de agentes de control de mosquitos y otros insectos, ya que son ricos en compuestos con actividad biológica, son biodegradables y se transforman en productos no tóxicos, son amigables con el medio ambiente y están potencialmente adecuados para su uso en los programas de control integral (21,30,31). De hecho, muchos investigadores han informado sobre la eficacia de los aceites esenciales como agentes contra larvas y ejemplares adultos y, asimismo, como repelentes (14,23,30-32).

En este contexto, el propósito de este trabajo fue revisar y evaluar las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años sobre la actividad larvicida de los aceites esenciales y sus componentes, así como los últimos reportes sobre sus posibles mecanismos de acción y los estudios hechos mediante modelado molecular. A continuación se presenta la actividad biológica contra las larvas de mosquitos de 81 aceites esenciales y 68 de sus moléculas.

Actividad larvicida de los aceites esenciales

Desde hace décadas se vienen utilizando diversas partes de las plantas y sus extractos como agentes repelentes e insecticidas contra distintas especies de insectos (30). El limoneno y el carvacrol, por ejemplo, son dos terpenos utilizados frecuentemente como insecticidas, en tanto que el aceite esencial de eucalipto se ha empleado ampliamente como repelente natural de insectos (31).

La actividad larvicida de los aceites esenciales y sus componentes generalmente se evalúan con el método propuesto por la OMS en el 2005 para estandarizar los procedimientos de evaluación de la actividad larvicida en el laboratorio y en campo (33). Varios autores han desarrollado sus propios criterios sobre lo que se considera un agente larvicida, pero la mayoría coincide en que un producto vegetal puede considerarse como un larvicida eficaz solo si tiene una concentración letal 50 (CL_{50}) por debajo de los 100 µg/ml (ppm) (32).

En el cuadro 1 se presenta la actividad de 81 aceites esenciales a las 24 horas de exposición en larvas de tercer y cuarto estadios. Los criterios de búsqueda fueron las palabras clave "actividad larvicida" y "aceites esenciales", y se incluyeron todos los reportes de actividad sobre *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* publicados entre 2010 y 2015. La búsqueda se llevó a cabo en las bases de datos de *Science Direct*, *Scientific Electronic Library Online* y *Google Scholar*.

Los aceites esenciales de plantas pertenecientes a las familias botánicas *Lamiaceae*, *Myrtaceae* y *Poaceae* se han reportado ampliamente como agentes repelentes y larvicidas (87). Gillij, *et al.,* demostraron que los aceites esenciales extraídos de catorce plantas tenían efecto repelente y larvicida contra *Ae. aegypti* (88).

Distintos extractos de *Cymbopogon* se han utilizado tradicionalmente para repeler a los mosquitos (89). Este género produce los repelentes naturales más utilizados en el mundo (87). La actividad larvicida de *C. flexuosus* y *C. martinii* se ha evaluado en larvas de *Ae.aegypti*, con una CL_{50} de 17,1 y 87,88 µg/ml, respectivamente (51,52). Los aceites esenciales del género *Cymbopogon* se caracterizan por tener altas concentraciones de geraniol y sus derivados.

Los de *Ocimum* spp. también se han utilizado tradicionalmente como repelentes (90). En *O. basilicum* se ha demostrado una actividad larvicida relevante. Govindarajan, *et al*., reportaron que este aceite esencial tiene una CL_{50} menor de 15 µg/ml contra larvas de *Ae. albopictus*, *An. subpictus* y *Cx. tritaeniorhynchus*, en tanto que el de *Ocimum sanctum* registra una CL_{50} mayor de 90 µg/ml (51).

Las propiedades repelentes y larvicidas del género *Eucalyptus* spp. contra mosquitos y otros artrópodos dañinos están bien documentadas (91). El aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, por ejemplo, posee actividad larvicida contra *Ae. aegypti* (43), y los de *E. gunii*, *E. saligna* y *E. tereticornis* han presentado una CL_{50} cercana a 20 µg/ml (59). Por otro lado, el aceite esencial de *E. citriodora* no registra una buena actividad repelente contra *Ae. aegypti*, pero sí contra *An. dirus* y *Cx. quinquefasciatus* (92), y los de *E. urophylla* y *E. citriodora* no poseen actividad larvicida relevante (52,57), lo cual pone de manifiesto que la actividad larvicida no se presenta siempre y que, incluso, puede depender del sexo.

Los aceites esenciales extraidos del género *Cinnamomum* poseen una importante actividad larvicida; de hecho, se ha reportado que el de *C. zeylanicum* es el de mayor actividad repelente, pues en una concentración de 0,11 µg/cm^2 logra repeler el 100 % de los mosquitos de *An. stephensi* y *Cx. quinquefasciatus* durante ocho horas, aproximadamente (93). Por lo general, el cinamaldehído es el componente mayoritario de los aceites esenciales de este género. A este fenilpropano se le han atribuido varios tipos importantes de actividad biológica (48).

Cuadro 1. Actividad larvicida de aceites esenciales después de 24 horas de exposición en larvas de mosquitos anofelinos y culicinos de tercer y cuarto estadio

Aceite esencial	Componentes principales	CL_{50} (µg/ml)	Especie	Referencia
Achillea millefolium	Crisantenona, borneol	154,1	*Cx. pipiens*	34
Allium macrostemon	Trisulfuro de dimetilo	72,8	*Ae. albopictus*	35
Allium monanthum	Trisulfuro de dimetilo	23,1	*Ae. aegypti*	36
Allium tuberosum	Trisulfuro de metil alilo	18,0	*Ae. albopictus*	35
Angelica dahurica	Alfa-pineno	> 125...	*Ae. aegypti*	37
Angelica pubescentis	Alfa-pineno, *p*-cimeno	> 125...	*Ae. aegypti*	37
Alpinia purpurata	beta-cariofileno, beta-pineno	71,5	*Ae. aegypti*	38
Apium graveolens	Limoneno	42,0	*Ae. aegypti*	39
Artemisia annua	ND	244,5	*An. sinensis*	40
		276,1	*Ae. aegypti*	
		374,9	*Cx. quinquefasciatus*	
Artemisia gilvescens	Alcanfor, eucaliptol	49,9	*An. anthropophagus*	41
Asarum heterotropoides	Metil eugenol, safrol	23,8	*Ae. aegypti*	42
Atalantia monophylla	Metil eugenol	93,2	*Ae. aegypti*	43
		50,1	*An. stephensi*	
		80,8	*Cx. quinquefasciatus*	
Atalantia racemosa		97,0	*Ae. aegypti*	43
	Alfa-asarona, sabineno	72,3	*An. stephensi*	
		86,1	*Cx. quinquefasciatus*	
Blumea densiflora	Borneol, germacreno D	10,5	*An. anthropophagus*	44
Blumea mollis	Linalol, gamma-elemeno	71,7	*Cx. quinquefasciatus*	45
Cananga odorata	Acetato de bencilo, linalol	52,9	*Ae. aegypti*	46
Capraria biflora	Alfa-humuleno	73,3	*Ae. aegypti*	47
Carum carvi	Carvona	54,6	*Ae. aegypti*	39
Cinnamomum osmophloeum	Cinamaldehído, propanol benceno	40,8	*Ae. albopictus*	48
		31,0	*Cx. quinquefasciatus*	
		22,0	*A. subalbtus*	
Citrus aurantifolia	Limoneno, beta-pineno	57,4	*An. gambiae*	49
Citrus limon	Limoneno, beta-pineno	9,0	*Ae. albopictus*	50
	Limoneno	13,7	*An. gambiae*	49
Citrus paradise	Limoneno, beta-pineno	10,4	*Ae. albopictus*	50
Citrus reticula	Limoneno	33,1	*An. gambiae*	49
Citrus sinensis	Limoneno, beta-pineno	6,3	*Ae. albopictus*	50
	Limoneno, mirceno	85,9	*Ae. aegypti*	51
	Limoneno	20,6	*Ae. aegypti*	52
	Limoneno	37,4	*An. gambiae*	49
Clausena anisata	Beta-pineno, sabineno, germacreno D, estragol	140,9	*Cx. quinquefasciatus*	53
		130,1	*Ae. aegypti*	
		119,5	*An. stephensi*	
Coleus aromaticus	Timol, terpinen-4-ol	72,7	*Cx. tritaeniorhynchus*	54
		67,9	*Ae. albopictus*	
		60,3	*An. subpictus*	
Curcuma longa	Turmerona aromática	8,9	*Ae. aegypti*	55
		1,8	*An. quadrimaculatus*	
Cupressus benthamii	Limoneno, 3-careno	37,5	*Ae. albopictus*	56
Cupressus macrocarpa	Sabineno, beta-pineno	54,6	*Ae. albopictus*	
Cupressus sempervirens	Alfa-pineno, 3-careno	54,7	*Ae. albopictus*	
Cymbopogon flexuosus	Geranial, neral	17,1	*Ae. aegypti*	52
Cymbopogon martinii	Acetato de farnesilo	87,8	*Ae. aegypti*	51
Eucalyptus camaldulensis	Alfa-pineno, *p*-cimeno, Alfa-felandreno	31,0	*Ae. aegypti*	57
		55,3	*Ae. albopictus*	
Eucalyptus citriodora	Citronelal, citronelol	71,2	*Ae. aegypti*	52
Eucalyptus grandis	Alfa-pineno, beta-pineno	32,4	*Ae. aegypti*	58
Eucalyptus saligna	1,8-cineol, *p*-cimeno	22,1	*Ae. aegypti*	59
Eucalyptus tereticornis	Beta-felandreno, 1,8-cineol	22,1	*Ae. aegypti*	
Eucalyptus urophylla	1,8-cineol, alfa-pineno, ocimeno cis	95,5	*Ae. aegypti*	57
		285,8	*Ae. albopictus*	
Foeniculum vulgare	*Trans*-anetol, aldehído anísico	32,7	*An. cracens*	60
	trans-anetol, limoneno	37,1	*Ae. aegypti*	61
Guaterria blepharophylla	Óxido de cariofileno	58,7	*Ae. aegypti*	62
Guaterria freisiana	Beta-eudesmol	52,6	*Ae. aegypti*	
Guatteria hispida	Beta-pineno, alfa-pineno	85,7	*Ae. aegypti*	
Haplophyllum tuberculatum	Cis-p-menth-2-en-1-ol	175,2	*Cx. pipiens*	34
Illicium henryi	Safrol, miristicina	35,4	*Ae. albopictus*	63

Aceite esencial	Componentes principales	CL_{50} (µg/ml)	Especie	Referencia
Juniperus phoenicea	Alfa-pineno, 3-careno	55,5	*Ae. albopictus*	56
Laurus nobilis	1,8-cineol	> 125...	*Ae. aegypti*	64
Lippia alba	Carvona, limoneno	42,2	*Ae. aegypti*	52
Lippia gracilis	Carvacrol	98,0	*Ae. aegypti*	65
Lippia origanoides	Carvacrol, *p*-cimeno	53,3	*Ae. aegypti*	52
Lippia polystachya	Alfa-tujona	121,0	*Cx. quinquefasciatus*	66
Lippia sidoides	Timol	25,5	*Ae. aegypti*	67
Lippia turbinata	Alfa-tujona	74,9	*Cx. quinquefasciatus*	66
Mentha longifolia	Óxido de piperitenona	59,3	*Cx. pipens*	68
Mentha spicata	Óxido de piperitenona	52,8	*Cx. pipens*	
Mentha suaveolens	Óxido de piperitenona	47,8	*Cx. pipens*	
Mentha x villosa	Rotundifolona	45,0	*Ae. aegypti*	69
Myristica fragrans	Sabineno	93,6	*Ae. qegypti*	51
Myristica fragrans	Safrol	40,0	*An. cracens*	60
Nigella sativa	Timol, alfa-felandreno	99,9	*Ae. aegypti*	70
		53,9	*An. stephensi*	
		141,7	*Cx. quinquefasciatus*	
Ocimum basilicum	Linalol, metil eugenol	14,0	*Cx. tritaeniorhynchus*	71
		11,9	*Ae. albopictus*	
		9,7	*An. subpictus*	
Ocimum sanctum	Eugenol	92,4	*Ae. aegypti*	51
Plectranthus mollis	Piperitona, fenchona	118,5	*Ae. aegypti*	72
		137,2	*An. sfttephensi*	
		128,1	*Cx. quinquefasciatus*	
Pimpinella anisum	*Trans*-anetol	26,1	*Cx. quinquefasciatus*	73
Pinus brutia	Alfa-pineno, beta-pineno	67,0	*Ae. albopictus*	74
Pinus halepensis	Beta-cariofileno	70,2	*Ae. albopictus*	
Pinus stankewiczii	Beta-pineno, germacreno D, alfa-pineno	80,1	*Ae. albopictus*	
Piper sarmentosum	Croweacina, beta-cariofileno	16,0	*An. cracens*	60
Pogostemon cablin	Alfa-pachuleno, Alfa-guaieno	25,1	*Ae. aegypti*	75
		21,8	*An. stephensi*	
		20,4	*Cx. quinquefasciatus*	
Polygonum hydropiper	Confertifolin	189,0	*An. sfephensi*	76
		217,0	*Cx. quinquefasciatus*	
Ruta chalepensis	2-undecanona	33,1	*Ae. albopictus*	77
	2- undecanona, 2-nonanona	2,6	*Ae. aegypti*	78
	2-nonanona, 2-undecanona	22,2	*Ae. aegypti*	79
		14,9	*An. quadrimaculatus*	
Salvia elegans	Guaiol, eudesmol	14,4	*Ae. aegypti*	80
		10,9	*An. quadrimaculatus*	
Salvia leucantha	Óxido de cariofileno	29,5	*Ae. aegypti*	
		6,2	*An. quadrimaculatus*	
Salvia officinalis	Viridiflorol	56,9	*Ae. aegypti*	
		14,1	*An. quadrimaculatus*	
Satureja hortensis	Carvacrol, gamma-terpineno	36,1	*Cx. quinquefasciatus*	81
Siparuna guianensis	Beta-mirceno, 2-undecanona	1,7	*Ae. aegypti*	82
		1,3	*Cx. quinquefasciatus*	
Swinglea glutinosa	Beta-pineno, piperitenona	65,7	*Ae. aegypti*	52
Syzigium aromaticum	Eugenol	63,3	*Ae. aegypti*	83
Tagetes erecta	Piperitona	79,7	*Ae. aegypti*	84
Tagetes filifolia	*Trans*-anetol	47,7	*Ae. aegypti*	85
Tagetes lucida	Metil-chavicol	66,2	*Ae. aegypti*	52
Tagetes minuta	*Trans*-ocimenona	52,3	*Ae. aegypti*	85
Tetraclinis articulata	Alfa-pineno, acetato de bornilo	70,6	*Ae. albopictus*	56
Tetradium glabrifolium	2-tridecanona, 2-undecanona	8,2	*Ae. albopictus*	86
Thymus satureioides	Timol, borneol	43,6	*Cx. quinquefasciatus*	81
Thymus vulgaris	Timol, *p*-cimeno	32,9	*Cx. quinquefasciatus*	
	timol	17,3	*Ae. aegypti*	22
	timol, o-cimeno	2,4	*Ae. aegypti*	78
Toddalia asiatica	Umbelulona	52,6	*Ae. aegypti*	64
Zanthoxylum avicennae	Silvestreno	27,5	*Ae. aegypti*	78
Zanthoxylum fagara	1,8-cineol	11,0	*Ae. albopictus*	79
Zanthoxylum limonella	Metil-heptil-cetona	15,5	*Cx. quinquefasciatus*	80
		7,5	*Ae. aegypti*	
Zanthoxylum oxyphyllum	1,8-cineol	63,1	*An. cracens*	60
Zingiber officinale	Zingibereno	15,8	*Ae. albopictus*	80
		21,8	*Cx. quinquefasciatus*	

También se ha comprobado una relevante actividad larvicida en los cítricos. Los aceites esenciales de *Citrus limon* y *C. sinensis* son los de mayor actividad larvicida en *Ae. albopictus*, con una CL_{50} de 9,08 y 6,33 µg/ml, respectivamente (50). El aceite esencial de *C. sinensis* se ha estudiado ampliamente, y en las publicaciones revisadas se registra una tendencia a la resistencia de *Ae. aegypti* a dicho aceite (51). La mayoría de los autores han propuesto que la actividad presente en los aceites esenciales del género *Citrus* se debe al limoneno, el terpeno más abundante en ellos (48,52).

Existen varios informes de que los compuestos 2-undecanona y 2-nonanona son los mayoritarios en el aceite esencial de *Ruta chalepensis* y los responsables de su actividad repelente y larvicida. A una concentración de 0,080 µg/cm^2, este aceite tiene un porcentaje de repelencia de 90 % y un tiempo de protección de 90 minutos (77), y varios autores han demostrando su eficacia como repelente y larvicida contra *Ae. aegypti* y *An. quadrimaculatus* (78).

Los aceites esenciales con mayor actividad larvicida reportada en la presente revisión fueron los de *Curcuma longa* y *Siparuna guianensis.* Ali, *et al*., reportaron que el aceite esencial de *C. longa* tiene una CL_{50} de 1,8 µg/ml contra *An. quadrimaculatus* y que la turmerona aromática es su compuesto mayoritario (55). Por su parte, Aguiar, *et al*., reportaron una CL_{50} de 1,76 y 1,36 µg/ml contra *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente, con el aceite esencial de *S. guianensis*, el cual está principalmente constituido por beta-mirceno y 2-undecanona (82). Por otro lado, los aceites esenciales con menor actividad larvicida fueron los de *Achillea millefolium*, *Angelica dahurica*, *Angelica pubescentis*, *Artemisia annua*, *Clausena anisata*, *Coriandrum sativum*, *Croton heliotropiifolius*, *Haplophyllum tuberculatum*, *Laurus nobilis*, *Plectranthus mollis* y *Polygonum hydropiper*, todos ellos con actividades mayores de 100 µg/ml (34,40,53,72).

Como ya se mencionó, los aceites esenciales son mezclas complejas, y su actividad repelente y larvicida se ha correlacionado, por lo general, con sus componentes mayoritarios. Sin embargo, es bien conocido que todos sus componentes pueden interactuar y modular la actividad biológica (94).

Actividad larvicida de las moléculas puras y efecto de sinergia y antagonismo

Los reportes sobre la actividad repelente y larvicida de los componentes puros son más escasos en comparación con los relacionados con los aceites esenciales. En la presente revisión, se recopilaron informes sobre la actividad larvicida de 68 componentes de diversos aceites esenciales (cuadro 2) y en la figura 1 se pueden observar las estructuras químicas de las moléculas con mayor actividad larvicida.

Algunos de los compuestos con mayor actividad larvicida son la 2-undecanona y el 1-tridecanol, con una CL_{50} de 2,1 y 9,95 µg/ml, respectivamente (79,37). Liu, *et al*., reportaron una CL_{50} de 2,86 µg/ml para la 2-tridecanona (86). Varios fenilpropanoides, como el *trans*-anetol, el cinamaldehído o el eugenol, han presentado una importante actividad larvicida, en tanto que la alfa-asarona fue el fenilpropanoide con mayor actividad larvicida, con una CL_{50} de 2,7 y de 2,8 µg/ml contra *Cx. pipens* y *Ae. aegypti,* respectivamente (42). El alfa-cariofileno y el beta-cariofileno, este último con actividad repelente relevante, no han presentado actividad larvicida (41,102), mientras que el óxido de cariofileno sí. Los sesquiterpenos con mayor actividad fueron la lactona de dehidrocostus y la costunolida, con una CL_{50} de 2,34 y 3,26 µg/ml contra *Ae. albopictus* (107), y el confertifolin con una LC_{50} de 3,09 y 4,18 µg/ml contra *An. sfttephensi* y *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente (76).

Ali, *et al*., evaluaron la actividad repelente y larvicida de la 2-nonanona y la 2-undecanona para determinar qué componente era el responsable de la actividad del aceite esencial de *R. chalepensis* (79). Sus resultados demostraron que se requieren concentraciones menores de 2-undecanona para repeler mosquitos y eliminar larvas de *Ae. aegypti* y *An. quadrimaculatus*. Estos datos sobre el efecto del aceite esencial en su conjunto y de los componentes mayoritarios por separado, son interesantes. El aceite esencial de *R. chalepensis* ha registrado una CL_{50} de 22,2 µg/ml contra larvas de *Ae. aegypti*, mientras que la de su compuesto mayoritario es de CL_{50} de 14,37 µg/m, lo cual permitiría concluir que la 2-undecanona es la responsable de la actividad larvicida del aceite esencial; sin embargo, es importante resaltar que el aceite esencial en su conjunto posee menor actividad, por lo que se podría concluir que se produce un efecto antagónico entre todos sus componentes.

Los efectos sinérgicos y antagónicos de los componentes de los aceites esenciales se han demostrado (111) y se han discutido con anterioridad (112,113). Se demostró, por ejemplo, que las combinaciones de linalol y 1,8-cineol tenían efectos sinérgicos en

Cuadro 2. Actividad larvicida de los componentes de aceites esenciales después de 24 horas de exposición en larvas de mosquitos anofelinos y culicinos de tercer y cuarto estadio

Compuesto	CL_{50} (µg/ml)	Especie	Referencia
Alcanfor	129,1	*An. anthropophagus*	41
4-alilanisol	36,0	*Cx. quinquefasciatus*	95
Trans-anetol	25,7	*Ae. aegypti*	94
	15,7	*An. atroparvus*	96
	16,0	*Cx. quinquefasciatus*	97
	21,0	*Cx. quinquefasciatus*	98
Alfa-asarona	2,7	*Cx. pipens*	42
	2,8	*Ae. aegypti*	
Benzaldehído	47,0	*Ae. albopictus*	48
Borneol	24,6	*Ae. aegypti*	94
	610,0	*Ae. aegypti*	99
Alfa-bulneseno	27,2	*Ae. aegypti*	100
	24,6	*An. sfttephensi*	
	23,8	*Cx. auinquefasciatus*	
Canfeno	220,0	*Ae. aegypti*	99
3-Careno	42,9	*An. quadrimaculatus*	101
Alfa-cariofileno	> 200	*An. anthropophagus*	41
Beta-Cariofileno	1038,0	*Ae. aegypti*	102
	49,4	*An. anthropophagus*	41
Óxido de cariofileno	29,8	*Ae. aegypti*	86
	69,0	*Ae. aegypti*	99
	70,0	*Ae. aegypti*	65
	28,0	*Cx. quinquefasciatus*	95
	44,3	*Cx. pipens*	103
Carveol	170,1	*Cx. pipens*	103
Carvona	132,0	*Cx. quinquefasciatus*	95
Catecol	14,7	*Cx. pipens*	103
Clorotimol	19,2	*Ae. aegypti*	104
P-cimeno	46,7	*Ae. albopictus*	94
	23,2	*Ae. aegypti*	
	12,4	*Ae. aegypti*	105
	21,0	*Cx. quinquefasciatus*	95
	48,1	*Ae. albopictus*	48
Cinamaldehído	37,5	*Cx. quinquefasciatus*	95
	27,6	*An. subalbatus*	
	41,0	*Cx. quinquefasciatus*	
	58,9	*Cx. pipens*	103
1,8-cineol	57,2	*Ae. aegypti*	58
	78,9	*Cx. pipens*	106
	74,9	*Ae. aegypti*	105
	53,6	*Ae. aegypti*	
	15,6	*Ae. aegypti*	94
Citronelal	63,0	*Cx. quinquefasciatus*	95
	45,8	*Ae. aegypti*	10,
Beta-citronelol	40,7	*An. anthropophagus*	95
	18,6	*Ae. albopictus*	
	49,1	*Cx. quinquefasciatus*	
Confertifolin	4,1	*Cx. quinquefasciatus*	107
	3,2	*Ae. albopictus*	
Costunolida	2,3	*Ae. albopictus*	107
Lactona de dehidrocostus	5,2	*Ae. aegypti*	37
1-dodecanol	14,1	*Cx. quinquefasciatus*	53
	12,7	*Ae. qegypti*	
Estragol	11,1	*An. stephensi*	96
	56,1	*An. atroparvus*	
	46,4	*Ae. aegypti*	106
	> 200	*An. anthropophagus*	41
Eucaliptol	6,8	*Ae. aegypti*	94
	88,1	*Ae. aegypti*	99
	117,1	*Cx. quinquefasciatus*	95
	88,1	*Ae. aegypti*	99
	39,3	*Ae. aegypti*	108
Epóxido de carvona	243,0	*Ae. aegypti*	99
Epóxido de limoneno	42,2	*Cx. quinquefasciatus*	53

Compuesto	CL_{50} (µg/ml)	Especie	Referencia
Floralol	58,2	*An. anthropophagus*	50
	5,1	*Ae. albopictus*	
Geranial	58,4	*Ae. aegypti*	108
	25,2	*An. anthropophagus*	109
Geraniol	30,1	*Ae. albopictus*	
	49,3	*Ae. aegypti*	110
	106,4	*Cx. pipens*	103
	21,2	*Cx. quinquefasciatus*	53
Germacreno D	18,7	*Ae. aegypti*	41
	16,9	*An. stephensi*	
	49,8	*An. anthropophagus*	
	26,3	*Ae. aegypti*	100
Alfa-guaieno	23,2	*An. sfttephensi*	99
	21,6	*Cx. quinquefasciatus*	
	177,2	*Ae. aegypti*	
Hidroxicarvona	96,3	*Cx. pallens*	23
Alfa-humuleno	108,6	*Ae. aegypti*	99
	110,8	*Ae. albopictus*	
	107,3	*An. sinensis*	
	598,0	*Ae. aegypti*	
Isoborneol	91,0	*Cx. quinquefasciatus*	95
Isoeugenol	32,5	*Ae. albopictus*	109
Trans-isopulgenona	18,1	*Ae. aegypti*	104
Limoneno	32,7	*Ae. albopictus*	
	19,8	*Ae. albopictus*	109
	9,6	*Ae. albopictus*	50
	13,2	*Cx. pipens*	106
	41,7	*Ae. albopictus*	86
Linalol	386	*Ae. aegypti*	94
	35,1	*An. stephensi*	
	99,5	*Ae. aegypti*	
	247	*Cx. quinquefasciatus*	95
Mentol	189	*Cx. quinquefasciatus*	95
	7,0	*Cx. pipens*	42
Metil-eugenol	19,3	*Ae. aegypti*	36
Metil-propil-trisulfida	120,3	*Ae. aegypti*	37
Beta-mirceno	167	*Cx. quinquefasciatus*	95
	76,9	*Cx. pipens*	106
	72,9	*Ae. aegypti*	108
Miristicina	44,3	*Ae. aegypti*	110
	67,9	*An. anthropophagus*	
Nerol	9,0	*Ae. aegypti*	23
	9,8	*Cx. pallens*	
Trans-nerolidol	13,8	*Ae. aegypti*	79
	16,3	*Ae. albopictus*	100
	20,8	*An. ainensis*	
	106,9	*Ae. aegypti*	
	65,5	*An. auadrimaculatus*	
2-nonanona	24,2	*Ae. aegypti*	104
	22,4	*An. afttephensi*	
Alfa-pachuleno	21,2	*Cx. quinquefasciatus*	101
	16,6	*Ae. aegypti*	
	39,9	*Ae. albopictus*	
Alfa-felandreno	11,4	*Ae. aegypti*	58
	15,6	*An. quadrimaculatus*	
	15,4	*Ae. aegypti*	104
	> 50	*Ae. aegypti*	
Alfa-pineno	> 50	*Ae. albopictus*	94
	20,7	*Ae. aegypti*	50
	6,4	*Ae. albopictus*	
	15,8	*Ae. aegypti*	105
	12,1	*Ae. aegypti*	58
	32,2	*Cx. quinquefasciatus*	53
Beta-pineno	23,1	*An. stephensi*	50
	30,7	*Ae. aegypti*	
	7,4	*Ae. albopictus*	
	12,8	*Cx. pipens*	106

Compuesto	CL_{50} (µg/ml)	Especie	Referencia
Perrillaldehído	15,1	*Ae. aegypti*	94
Pulegona	25,1	*Cx. quinquefasciatus*	53
Rotundifolona	21,2	*Ae. aegypti*	106
Sabineno	19,6	*An. stephensi*	104
	8,2	*Cx. pipens*	
	9,8	*Ae. aegypti*	
Safrol	28,4	*Ae. aegypti*	106
	35,6	*Ae. albopictus*	
Terpinoleno	11,8	*Cx. pipens*	95
	15,3	*Ae. aegypti*	
	21,1	*Cx. quinquefasciatus*	
	14,0	*Ae. aegypti*	101
	20,9	*An. quadrimaculatus*	104
Alfa-terpineno	74,1	*Ae. aegypti*	95
	> 250	*Cx. quinquefasciatus*	
	21,3	*Cx. pallens*	23
	21,2	*Ae. albopictus*	50
	27,1	*An. sinensis*	
	56.0	*Ae. aegypti*	
	6.2	*Ae. albopictus*	
Gamma-terpineno	0.4	*Ae. aegypti*	105
	26.0	*Cx. quinquefasciatus*	95
	24.7	*Cx. pallens*	23
	27.5	*Ae. aegypti*	94
	30.0	*Ae. albopictus*	41
	36.4	*An. sinensis*	
	8.5	*Ae. aegypti*	
	76.7	*An. anthropophagus*	
4-terpineol	3.3	*Ae. aegypti*	105
	45.8	*Cx. pallens*	23
	42.4	*Ae. aegypti*	105
	52.6	*Ae. albopictus*	
	52.8	*An. sinensis*	95
	76.6	*Ae. aegypti*	
	> 250	*Cx. quinquefasciatus*	
Alfa-terpineol	35,0	*Cx. pallens*	23
	31,9	*Ae. aegypti*	94
	36,7	*Ae. albopictus*	54
	39,9	*An. sinensis*	
	19,8	*Ae. aegypti*	
	28,1	*Cx. tritaeniorhynchus*	
Timol	24,8	*Ae. albopictus*	99
	22,6	*An. subpictus*	65
	81,0	*Ae. aegypti*	95
	18,0	*Cx. quinquefasciatus*	
	2,1	*Ae. aegypti*	37
	2,8	*Ae. albopictus*	86
1-tridecanol	9,9	*Ae. albopictus*	86
2-tridecanona	14,3	*Ae. aegypti*	79
Umbelulona	14,2	*An. quadrimaculatus*	99
2-undecanona	2,1	*Ae. aegypti*	79

la mortalidad de diversos insectos (114), en tanto que la mezcla de timol y *trans*-anetol tenía efectos sinérgicos sobre la actividad larvicida contra *Spodoptera litura* (115). Estos resultados indican que la actividad larvicida de los aceites esenciales no se asocia únicamente con los compuestos mayoritarios, sino que otras moléculas presentes en menor proporción también contribuyen a su actividad (111-115).

El estudio de los efectos sinérgicos se orienta a encontrar mezclas de compuestos que produzcan mejores efectos con menor concentración. En un amplio estudio, se demostró el efecto sinérgico de más de 20 sustancias en diferentes combinaciones contra larvas de *Cx. quinquefasciatus*; entre las combinaciones más efectivas se encontraron las de limoneno con *trans*-anetol y de carvona con carvacrol (116). Por otro lado, en este mismo estudio,

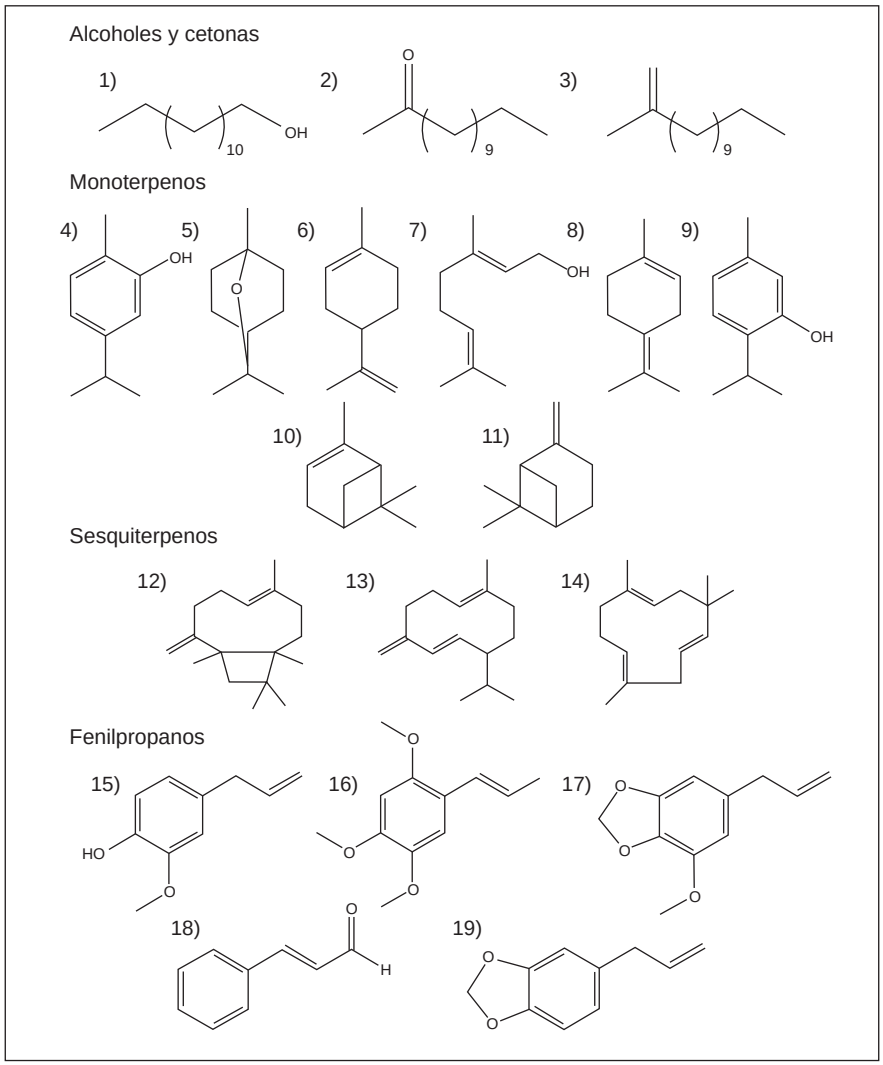


Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos con mayor actividad larvicida. 1) 1-tridecanol; 2) 2-undecanona; 3) 2-tridecanona; 4) carvacrol; 5) eucaliptol; 6) limoneno; 7) geraniol; 8) terpinoleno; 9) timol; 10) alfa-pineno; 11) beta-pineno; 12) beta-cariofileno; 13) germacreno D; 14) beta-humuleno; 15) eugenol; 16) asarona; 17) miristicina; 18) cinamaldehído; 19) safrol

se señala que la actividad larvicida del borneol y el alcanfor se potencializa cuando se los mezcla, en tanto que de manera aislada no exhiben una actividad significativa. Liu, *et al*., también han estudiado los efectos sinérgicos y encontraron que la actividad repelente de la mezcla de aceites de *Artemisia princeps* y *Cinnamomum alcanfora* era significativamente mayor que la de cada uno de estos por separado (116).

Es necesario ampliar las investigaciones sobre los mecanismos implicados en las interacciones entre los componentes que mejoran o dificultan la actividad repelente y la larvicida, y resaltar la importancia de estudiar dichas actividades en los componentes puros, pues sus mecanismos de acción ofrecen resultados más claros e, incluso, permiten generar modelos predictivos basados en la relación entre su estructura y su actividad.

Relación entre estructura y actividad y entre propiedad y actividad

Existe una amplia documentación sobre estos dos tipos de relación de los fitoquímicos y de su actividad larvicida (117,118). Dichos estudios han contribuido a la búsqueda y el diseño de nuevos compuestos con mayor actividad larvicida, y han aportado información sobre su modo de acción en los insectos. Se ha reportado que los anillos aromáticos y los grupos hidroxilos resultan en un aumento de la actividad, particularmente en presencia de grupos fenólicos (119). Además, los

grupos hidroxilos parecen disminuir la actividad, ya que al sustituir un grupo carbonilo con un grupo hidroxilo, el resultado final es la disminución de la actividad larvicida (120).

García, *et al.*, por ejemplo, demostraron que de los monoterpenos pulegol (alcohol monoterpeno) y pulegona (cetona monoterpeno), el primero era menos tóxico contra los adultos de *Tribolium castaneum* (121), debido a que los grupos hidroxilo aumentan la polaridad de las moléculas, lo cual dificulta su penetración en las cutículas de las larvas (122).

Algunos autores han estudiado la importancia de los grupos cetónicos en la estructura de los terpenoides. Los reportes demuestran que la presencia de un grupo carbonilo exocíclico y el doble enlace conjugado parecen contribuir a la actividad larvicida (69). En general, la sustitución del doble enlace por un grupo epóxido disminuye la actividad (69,123). En otros estudios se ha demostrado la importancia de los dobles enlaces en las estructuras terpénicas. Por ejemplo, el beta-pineno tiene mayor actividad larvicida que el alfa-pineno contra *Ae. aegypti*, lo cual se ha asociado con el hecho de que el doble enlace del beta-pineno se encuentra fuera del anillo, mientras que el alfa-pineno tiene el doble enlace sobre este (58).

Se ha informado que los aldehídos aislados no son importantes para el efecto larvicida; sin embargo, cuando el aldehído está conjugado con un sistema aromático, esto contribuye positivamente a su actividad (124). Este efecto se observa en la gran potencia larvicida del cinamaldehído, un fenilpropanoide totalmente conjugado (103). De hecho, el número de dobles enlaces conjugados contribuye a aumentar la actividad. Se ha reportado que el *p*-cimeno, el timol, el carvacrol y el eugenol exhiben mayor actividad que la carvona, los pinenos y los terpinenos (99), lo cual evidencia que la influencia de la densidad electrónica y el carácter plano de estas estructuras tienen un papel importante en su actividad biológica (125).

Se ha evaluado la importancia del grupo éster en la actividad larvicida y se ha encontrado que, al sustituir el grupo hidroxilo por un grupo acetato, la actividad larvicida aumenta significativamente (69).

Además de los estudios sobre la relación de la actividad larvicida y la estructura, se han llevado a cabo otros sobre la relación entre las propiedades fisicoquímicas y moleculares y dicha actividad. Se ha observado que el carácter hidrófilo (*hydrofilicity*) y la capacidad de polarización (*refractivity*) molar se encuentran en relación negativa con la toxicidad de las cumarinas contra *Cx. pipens* y *Ae. aegypti* (118). Esta relación negativa también se ha informado en los terpenos y terpenoides con actividad larvicida (23). El carácter lipófilo de los aceites y sus componentes también tiene un rol clave. Se ha observado que la lipofilia está muy relacionada con la inhibición y la desactivación enzimática (21). La importancia de la lipofilia de los terpenos y terpenoides se ha confirmado al estudiar la relación entre propiedad y actividad, en los cuales el perfil hidrofóbico se ha relacionado estrechamente con la actividad larvicida (119). Lucía, *et al*., desarrollaron un modelo con base en la actividad de seis monoterpenos y observaron que, cuando los valores de la presión de vapor y el coeficiente de partición del octanol y el agua (LogP) disminuían, también lo hacía la concentración letal de la actividad larvicida contra *Ae. aegypti* (105).

Este acentuado efecto de la lipofilia se explica por el hecho de que el principal canal de entrada de los componentes en el organismo es táctil (cutícula externa), y el efecto larvicida se evalúa principalmente mediante la inmersión de larvas en un ambiente acuoso donde se aplica el aceite esencial, de manera que puede plantearse que la partición se produce entre el ambiente hidrófilo (agua) y un entorno lipófilo (epicutícula larval), por lo cual la hidrofobia de la molécula desempeña un papel importante en la intoxicación de la larva (126).

Otros descriptores relacionados con la actividad larvicida son el momento dipolar, el punto de ebullición y la presión de vapor (127). El momento dipolar es un indicador de la lipofilia y la hidrofobia (128) y se lo ha asociado con la actividad repelente (129). Por otra parte, se ha demostrado que los repelentes más eficaces poseen un punto de ebullición y una presión de vapor que les permite tener mayor tiempo de contacto con los mosquitos (127). En un estudio llevado a cabo con sesquiterpenos se encontró que la actividad repelente de estos compuestos se relacionaba principalmente con la presión de vapor y con parámetros electrónicos, así como con la capacidad de polarización de la molécula (POL) y el orbital molecular desocupado de menor energía (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO) (130), de tal manera que, en sus modelos, la actividad repelente aumentó a medida que disminuyó la capacidad de polarización, mientras que los parámetros LUMO mantuvieron una relación directa con la actividad. En la figura 2 se ilustra el mapeo de los orbitales frontera del orbital

molecular ocupado de mayor energía (*Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO) y del LUMO de sesquiterpenos con actividad larvicida.

Las energías del orbital molecular ocupado de mayor energía y del orbital desocupado de menor energía (E_{HOMO} y E_{LUMO}) forman parte de los descriptores mecánico-cuánticos más populares. De hecho, en muchos casos estos orbitales determinan la reacción química de un compuesto y el posible mecanismo de ella (125). El orbital HOMO se emplea como un indicador de las zonas de alta densidad electrónica, pues estas exhiben una región propicia para el ataque de compuestos electrófilos, mientras que un reactivo o compuesto nucleófilo es atraído hacia las zonas de más baja densidad electrónica indicadas por el orbital LUMO (125).

Mecanismo de acción

Muchos grupos de investigación se han centrado en la eficiencia larvicida de los aceites esenciales, sin embargo, hay poca información concluyente sobre su mecanismo de acción contra las larvas y los insectos adultos. La primera complicación se debe a que es difícil determinar los mecanismos de acción de un producto que no es una sustancia pura, sino una mezcla de varios componentes, ya que todas las interacciones entre los compuestos pueden influir en la actividad (131).

En algunos reportes se ha señalado que los aceites esenciales o sus componentes monoterpenoides producen intoxicación neurotóxica, similar a la producida por los organofosforados y carbamatos, mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (132,133). El efecto neurotóxico se produce cuando, en la transmisión del impulso nervioso, la acetilcolina es liberada de las vesículas de las terminales nerviosas cuando estas son despolarizadas y, a continuación, la acetilcolina ingresa a la sinapsis y se une al receptor postsináptico. Esta posee una vida media corta debido a la presencia de la acetilcolinesterasa, una enzima que hidroliza la unión éster de la molécula, con lo cual se interrumpe la actividad estimuladora. La inhibición de la acetilcolinesterasa prolonga la transmisión eléctrica, ya que la acetilcolina está estimulada (134).

En un estudio comparativo de la acción fumígena de los aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Labiatae y el limoneno en adultos de *Rhyzopertha dominica*, se demostró que los aceites esenciales en conjunto inhibían en 65 % la acetilcolinesterasa, en tanto que el limoneno

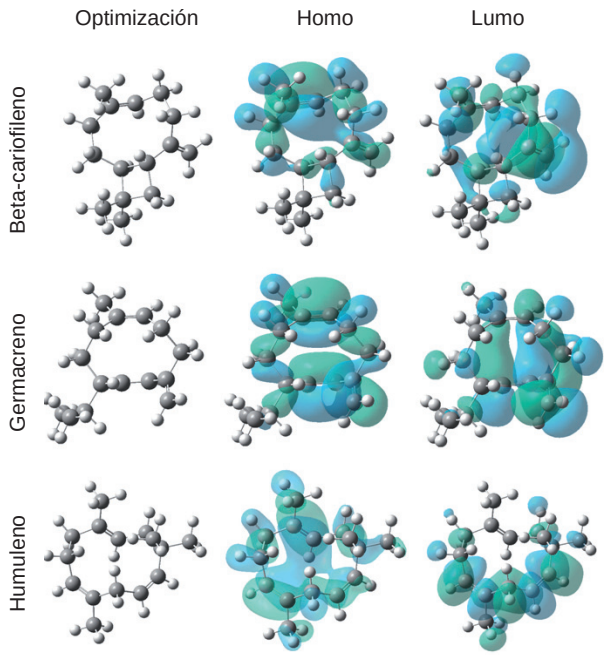


Figura 2. Mapeo de orbitales HOMO y LUMO de sesquiterpenos con actividad larvicida a partir de una optimización, y cálculo de la energía de nivel mediante el método de Hartree-Fock utilizando un conjunto de base 6-311(d,p): 1) beta-cariofileno; 2) germacreno D; 3) humuleno

lo hacía solamente en el 2 % (117). Además, los autores observaron que los aceites esenciales incrementaron significativamente los niveles de adenosín monofosfato cíclico (incluso con muy bajas concentraciones), lo cual sugiere una posible acción sobre la octopamina.

Se ha reportado también que el aceite esencial de *Artemisia maderaspatana* inhibe la acetilcolinesterasa con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 31,33 µg/ml (135). Enan, *et al.*, obtuvieron resultados similares en moscas y cucarachas expuestas a eugenol y alfa-terpineol y demostraron que estos compuestos producían efectos de excitación extrema en los insectos, ocasionando posteriormente la muerte (136).

También, se ha demostrado que el limoneno, el mirceno, el linalol y el terpineol son agentes neurotóxicos contra la mosca común (137), resultados que confirman la hipótesis de que el linalol es un fuerte inhibidor de la acetilcolinesterasa (138). De hecho, en estudios de simulación computacional se ha demostrado que el linalol es capaz de interactuar con dicha enzima en Ae. *aegypti*, lo cual demuestra que este se une a un sitio hidrofóbico interactuando con algunos aminoácidos lipófilos, como la glicina 412, 409, 412 y la isoleucina 413 (139).

Por otro lado, se ha reportado que el aceite esencial de *Zingiber officinale* altera el comportamiento del sistema colinérgico (140). Asimismo, se ha demostrado que el alfa-pineno y el beta-pineno son capaces de inhibir la acetilcolinesterasa, sin embargo, a pesar de que los pinenos inhiben fuertemente la enzima, no presentan actividad larvicida relevante (141,142), efecto que se ha atribuido a que los pinenos no logran penetrar la cutícula del insecto (143). Otros autores han demostrado que el beta-felandreno es un potente inhibidor de la acetilcolinestersa, al igual que el ocimeno cis y el estragol (144).

En otros estudios de acoplamiento molecular, se ha reportado que el eucaliptol y el carvacrol son capaces de unirse con mayor eficacia que la acetilcolina a la acetilcolinesterasa de *Ae. aegypti* (145). Asimismo, en estudios de simulación computacional se ha demostrado que el beta-cariofileno tiene mejor energía libre de enlace que la acetilcolinesterasa, por lo cual también constituye un inhibidor competitivo (146). Sin embargo, algunos autores concuerdan en que, en la mayoría de los casos, no hay relación entre la inhibición de la acetilcolinesterasa y los compuestos que demuestran tener mayor efecto larvicida, por lo cual han sugerido que el mecanismo de acción debe ser otro (144,145).

La octopamina también ha sido un blanco de los estudios sobre la actividad de los aceites esenciales. Está presente en el sistema nervioso de todos los insectos y actúa como neurotransmisor, neurohormona y neuromodulador (147). Otra función que se le atribuye está relacionada con el comportamiento activo o de "atención", por lo que se ha sugerido que forma parte de un sistema general que prepara al insecto para su actividad vigorosa. Algunos autores han planteado que los componentes de los aceites esenciales actúan bloqueando los receptores de la octopamina (131) y produciendo alteraciones neurológicas graves con efectos nocivos para los insectos. El eugenol y el timol, por ejemplo, pueden funcionar mediante el bloqueo de estos receptores (147,148). Con el acoplamiento molecular se ha demostrado que el carvacrol, el eugenol y el eucaliptol son capaces de interactuar en el sitio de unión del receptor oamb de la octopamina de *Ae. aegypti* (145).

Otro mecanismo propuesto es la interacción de los componentes de los aceites esenciales con los receptores GABA. Se ha demostrado que el timol, por ejemplo, interactúa con estos receptores en un sitio de unión aun no identificado (148,149). Algunos sesquiterpenos tricíclicos han resultado ser potentes inhibidores de estos receptores (150). Asimismo, la tujona, un monoterpenoide bicíclico, se ha clasificado como un insecticida neurotóxico que también actúa sobre estos receptores (151).

Recientemente, se reportó que los terpenos y los terpenoides son capaces de interactuar con la proteína transportadora de esterol (AeSCP-2) de *Ae. aegypti*, por lo que supone un nuevo y potencial blanco terapéutico (152).

La información que se ha reseñado permite concluir que los componentes de los aceites esenciales no tendrían un solo mecanismo de acción. Además, todo indica que ejercen diversos efectos en el insecto, una vez que atraviesan su cutícula.

Con respecto a la dilucidación del mecanismo de acción, son pocos los estudios de simulación computacional. Actualmente, la mayoría de los blancos propuestos para el control de *Ae. aegypti*, se encuentra en forma cristalizada, registrada en bases de datos como la del *Proteín Data Bank* (PDB) (145,148,152). En el caso de otros géneros y especies, las secuencias aminoacídicas de estas proteínas se encuentran en bases de datos como las del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esta información es de gran utilidad, ya que mediante herramientas computacionales como el acoplamiento y la dinámica molecular se puede llevar a cabo la búsqueda racional de posibles blancos biológicos y la dilucidación de sus mecanismos de acción, así como el diseño de nuevos compuestos larvicidas. La figura 3 ilustra las propuestas de blancos terapeúticos de los componentes de aceites esenciales, algunas de ellas contruídas por homología en nuestro grupo de investigación.

Conclusiones

En la búsqueda de alternativas reales que puedan aplicarse en los programas de control de enfermedades transmitidas por vectores, los aceites esenciales constituyen una excelente alternativa por su considerable potencial como repelentes y larvicidas, su bajo nivel de toxicidad para los mamíferos y su limitado impacto ambiental. Además, algunos, como el metileugenol, la alfa-asarona y la pelitorina, han demostrado ser eficaces contra *Cx. p. pallens* resistente a clorpirifos, fenitrotión, fentión y alfa-cipermetrina.

La actividad repelente y larvicida de los aceites esenciales es de gran importancia porque demuestra que no es necesario producir un compuesto

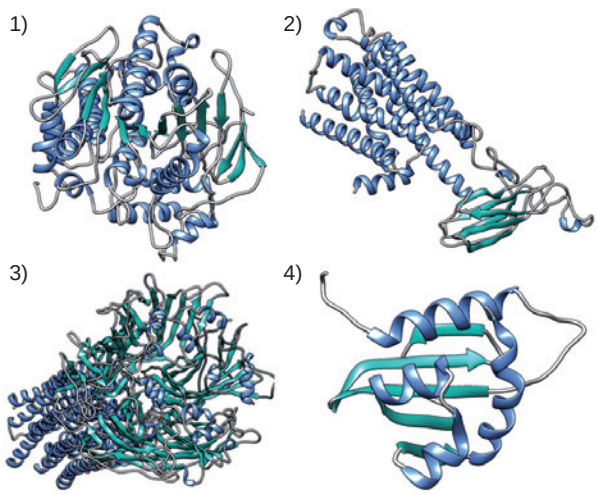


Figura 3. Dianas biológicas implicadas en el mecanismo de acción de los aceites esenciales y sus componentes. 1) Acetilcolinesterasa de *Ae. aegypti* modelada por homología utilizando la secuencia GenBank ABN09910.1, y usando como templete el modelo el PDB: 2W6C; 2) receptor oamb de octopamina de *An. sinensis* modelada por homología utilizando la secuencia GenBank KFB42017.1, y usando como templete el modelo el PDB: 2Y03; 3) receptor GABA de *Cx. quinquefaciatus* modelado por homología utilizando la secuencia GenBank EDS38917.1, y usando como templete el modelo el PDB: 5CFB; 4) proteína transportadora de esterol de *Ae. aegypti* cristalizada reportada con el PDB: 2KSH.

activo puro, ya que el uso de varios de ellos en conjunto puede ser una solución más barata, eficaz y sencilla. Asimismo, el estudio de los efectos sinérgicos entre los componentes de los aceites esenciales y las mezclas de ellos ha abierto el camino para el reemplazo de los productos sintéticos utilizados tradicionalmente.

El estudio de los componentes puros es crucial para entender el mecanismo de la acción que ejercen sobre las larvas y los moquitos adultos. Por otra parte, las nuevas herramientas computacionales todavía no se han explorado suficientemente, por lo que representan un área de estudio prometedora para la dilucidación de los mecanismos de acción, y el diseño y la búsqueda racional de moléculas con actividad larvicida.

La mayoría de las investigaciones sobre aceites esenciales como nuevos agentes larvicidas se ha llevado a cabo en laboratorio, pero si se los quiere proponer como una solución real y utilizarlos en los programas de salud pública, se requiere la investigación en campo, de manera que las condiciones geográficas y climáticas sean las que determinen la factibilidad y pertinencia de su uso.

Conflicto de intereses

Los autores del presente trabajo declaramos no tener conocimiento de ninguna circunstancia que constituya un conflicto de interés, ya sea afectivo, potencial o aparente.

Financiamiento

Sergio Andrade-Ochoa agredece el apoyo otorgado por CONACYT (Nº de registro 278488) para realizar sus estudios de posgrado, así como al Instituto Chihuahuense de la Juventud. Luvia E. Sánchez-Torres agradece el apoyo del proyecto SIP-201 50638 y es becaria de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional y del Programa de Estímulos al Desempeño de los Investigadores (EDI).

Referencias

1. **Kumar K, Sharma AK, Kumar S, Patel S, Sarkar M, Chauhan LS.** Multiple insecticide resistance/susceptibility status of *Culex quinquefasciatus*, principal vector of bancroftian filariasis from filaria endemic areas of northern India. Asian Pac J Trop Dis. 2011;4:426-9. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60119-3

2. **Tatem AJ, Huang Z, Das A, Qi Q, Roth J, Qiu Y.** Air travel and vector-borne disease movement. Parasitol. 2012;139:1816-30. https://doi.org/10.1017/S0031182012000352

3. **Ramaiah KD, Ottesen EA.** Progress and impact of 13 years of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis on reducing the burden of filarial disease. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e3319. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003319

4. **Campbell LP, Luther C, Moo-Llanes D, Ramsey JM, Danis-Lozano R, Peterson AT.** Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370:20140135. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0135

5. **Bhatia R, Dash AP, Sunyoto T.** Changing epidemiology of dengue in South-East Asia. WHO South East Asia J Public Health. 2013;2:23. https://doi.org/10.4103/2224-3151.115830

6. **Tolle MA.** Mosquito-borne diseases. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2009;39:97-140. https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2009.01.001

7. **Fischer D, Thomas SM, Suk JE, Sudre B, Hess A, Tjaden NB, *et al*.** Climate change effects on Chikungunya transmission in Europe: Geospatial analysis of vector's climatic suitability and virus' temperature requirements. Int J Health Geogr. 2013;12:51. https://doi.org/10.1186/1476-072X-12-51

8. **van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Blateau A, Rousset D, Matheus S, *et al*.** Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. Euro Surveill. 2014;19:20759.

9. **World Health Organization.** World Malaria Report 2015. Geneva: WHO; 2015. Fecha de consulta: 15 de junio de 2015. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/.

10. **Béguin A, Hales S, Rocklöv J, Åström C, Louis VR, Sauerborn R.** The opposing effects of climate change and socio-economic development on the global distribution of malaria. Glob Environ Chang. 2011;21:1209-14. https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2011.06.001

11. **Laniak GF, Olchin G, Goodall J, Voinov A, Hill M, Glynn P, *et al*.** Integrated environmental modeling: A vision and roadmap for the future. Environ Model Softw. 2013;39:3-23. https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2012.09.006

12. **Shuman EK.** Global climate change and infectious diseases. New Eng J Med. 2010;362:1061-3. https://doi.org/10.1056/NEJMp0912931

13. **Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W.** Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. Acta Trop. 2011;118:37-44. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007

14. **Miranda JE, Navickiene HM, Nogueira-Couto RH, De Bortoli SA, Kato MJ, da Silva Bolzani V, *et al*.** Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). Apidologie. 2003;34:409-15. https://doi.org/10.1051/apido:2003036

15. **Lin H, Chuan-hua X, Jin-jun W, Ming L, Wen-cai L, Zhi-mo Z.** Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). Pest Biochem Physiol. 2009;93:47-52. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.11.001

16. **Matowo J, Kitau J, Kabula B, Kavishe R, Oxborough R, Kaaya R, *et al*.** Dynamics of insecticide resistance and the frequency of kdr mutation in the primary malaria vector *Anopheles arabiensis* in rural villages of Lower Moshi, North Eastern Tanzania. J Parasitol Vector Biol. 2014;6:31-41. https://doi.org/10.5897/JPVB2013.0143

17. **Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, Della Torre A, Ranson H.** Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Pest Biochem Physiol. 2012;104:126-31. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.008

18. **Chino-Cantor A, Sánchez-Arroyo H, Ortega-Arenas LD, Castro-Hernández E.** Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) in Guerrero, México. Southwestern Entomol. 2014;39:601-12. https://doi.org/10.3958/059.039.0319

19. **Overgaard HJ, Sandve SR, Suwonkerd W.** Evidence of anopheline mosquito resistance to agrochemicals in northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health.2005;36(Suppl.4):152-7.

20. **Conde M, Orjuela LI, Castellanos CA, Herrera-Varela M, Licastro S, Quiñones ML.** Insecticide susceptibility evaluation in *Aedes aegypti* populations of Caldas, Colombia, in 2007 and 2011. Biomédica. 2015;35:43-52. https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2367

21. **Langenheim JH.** Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. J Chem Ecol. 1994;20:1223-80. https://doi.org/10.1007/BF02059809

22. **Wang ZQ, Perumalsamy H, Wang M, Shu S, Ahn YJ.** Larvicidal activity of *Magnolia denudata* seed hydrodistillate constituents and related compounds and liquid formulations towards two susceptible and two wild mosquito species. Pest Manag Sci. 2015;72:897-906. https://doi.org/10.1002/ps.4064

23. **Massebo F, Tadesse M, Bekele T, Gebre-Michael MB.** Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. Afr J Biotechnol. 2009;8:4183.

24. **Castillo S, Pérez-Alfonso CO, Martínez-Romero D, Guillén F, Serrano M, Valero D.** The essential oils timol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. Food Control. 2014;35:132-6. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.052

25. **Bakkali F, Averbeck S. Averbeck D, Idaomar M.** Biological effects of essential oils–a review. Food Chem Toxicol. 2008;46:446-75. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106

26. **Burt S.** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods–a review. Int J Food Microbiol. 2004;94:223-53. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

27. **Pesavento G, Calonico C, Bilia AR, Barnabei M, Calesini F, Addona R, *et al*.** Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. Food Control. 2015;54:188-99. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045

28. **Sarac N, Ugur A.** Antimicrobial activities of the essential oils of *Origanum onites* L., *Origanum vulgare* L. subspecies hirtum (Link) Ietswaart, *Satureja thymbra* L., and *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal. growing wild in Turkey. J Med Food. 2008;11:568-73. https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0520

29. **Santoro GF, das Graças Cardoso M, Guimarães LG, Salgado AP, Menna-Barreto RF, Soares MJ.** Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: *Kinetoplastida*) growth and ultrastructure. Parasitol Res. 2007;100:783-90. https://doi.org/10.1007/s00436-006-0326-5

30. **Prophiro JS, da Silva MA, Kanis LA, da Silva BM, Duque-Luna JE, da Silva OS.** Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. Parasitol Res. 2012;110:713-9. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2547-5

31. **Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S.** *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol Manag. 2008;256:2166-74. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008

32. **Kiran SR, Bhavani K, Devi PS, Rao BR, Reddy KJ.** Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Bioresour Technol. 2006;97:2481-4. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.003

33. **World Health Organization.** Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: WHO; 2005. Fecha de consulta: 15 de junio de 2015. Disponible en: http://www.who.int/whopes/guidelines/en/.

34. **Benelli G, Bedini S, Flamini G, Cosci F, Cioni PL, Amira S, *et al*.** Mediterranean essential oils as effective weapons against the West Nile vector *Culex pipiens* and the *Echinostoma* intermediate host *Physella acuta*: What happens around? An acute toxicity survey on non-target mayflies. Parasitol Res. 2015;114:1011-21. https://doi.org/10.1007/s00436-014-4267-0

35. **Liu XC, Liu QY, Zhou L, Liu ZL.** Evaluation of larvicidal activity of the essential oil of *Allium macrostemon* Bunge and its selected major constituent compounds against *Aedes albopictus* (Diptera: *Culicidae*). Parasit Vector. 2014;7:184. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-184

36. **Moon HI.** Larvicidal activity of major essential oils from stems of *Allium monanthum* Maxim. against *Aedes aegypti* L. J Enzyme Inhib Med Chem. 2011;26:827-30. https://doi.org/10.3109/14756366.2011.558842

37. **Tabanca N, Gao Z, Demirci B, Techen N, Wedge DE, Ali A, *et al*.** Molecular and phytochemical investigation of *Angelica dahurica* and *Angelica pubescentis* essential oils and their biological activity against *Aedes aegypti*, *Stephanitis pyrioides*, and *Colletotrichum* Species. J Agric Food Chem. 2014;62:8848-57. https://doi.org/10.1021/jf5024752

38. **Santos GK, Dutra KA, Barros RA, da Câmara CA, Lira DD, Gusmão NB, *et al*.** Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. Ind Crop Prod. 2012;40:254-60. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.020

39. **Pitasawat B, Champakaew D, Choochote W, Jitpakdi A, Chaithong U, Kanjanapothi D, *et al*.** Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. Fitoterapia. 2007;78:205-10. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.003

40. **Cheah SX, Tay JW, Chan LK, Jaal Z.** Larvicidal, oviposition, and ovicidal effects of *Artemisia annua* (Asterales: *Asteraceae*) against *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*). Parasitol Res. 2013;112:3275-82. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3506-0

41. **Zhu L, Tian Y.** Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Artemisia gilvescens* against *Anopheles anthropophagus*. Parasitol Res. 2013;112:1137-42. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3243-9

42. **Perumalsamy H, Chang KS, Park C, Ahn YJ.** Larvicidal activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide-susceptible and-resistant *Culex pipiens* pallens and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi*. J Agric Food Chem. 2010:58:10001-6. https://doi.org/10.1021/jf102193k

43. **Arun KD, Kumar S, Swamy JP.** Larvicidal activity and leaf essential oil composition of three species of genus *Atalantia* from south India. Int J Mos Res. 2015;2:25-9.

44. **Zhu L, Tian Y.** Chemical composition and larvicidal activity of *Blumea densiflora* essential oils against *Anopheles anthropophagus*: A malarial vector mosquito. Parasitol Res. 2011;109:1417-22. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2388-2

45. **Senthilkumar A, Kannathasan K, Venkatesalu V.** Chemical constituents and larvicidal property of the essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr. against *Culex quinquefasciatus*. Parasitol Res. 2008;103:959-62. https://doi.org/10.1007/s00436-008-1085-2

46. **Tan LTH, Lee LH, Yin WF, Chan CK, Abdul Kadir H, Chan KG, *et al*.** Traditional uses, phytochemistry, and bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang). Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:896314. https://doi.org/10.1155/2015/896314

47. **Souza LG, Almeida MC, Monte FJ, Santiago GM, Braz-Filho R, Lemos TL, *et al*.** Chemical constituents of *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) and larvicidal activity of essential oil. Química Nova. 2012;35:2258-62. https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100032

48. **Cheng SS, Liu JY, Huang CG, Hsui YR, Chen WJ, Chang ST.** Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. Bioresource Technol. 2009;100:457-64. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.030

49. **Akono PN, Dongmo PM, Tonga C, Kouotou S, Kekeunou S, Magne GT, *et al*.** Larvicidal activity of essential oils from pericarps of ripe *Citrus* fruits cultivated in Cameroon on pyrethroids sensitive and resistant strains of *Anopheles gambiae* Giles, 1902. J Entomol Zool Studies. 2015;3:334-9.

50. **Giatropoulos A, Papachristos DP, Kimbaris A, Koliopoulos G, Polissiou MG, Emmanouel N, *et al*.** Evaluation of bioefficacy of three *Citrus* essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: *Culicidae*) in correlation to their components enantiomeric distribution. Parasitol Res. 2012;111:2253-63. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3074-8

51. **Tennyson S, Samraj DA, Jeyasundar D, Chalieu K.** Larvicidal efficacy of plant oils against the dengue vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: *Culicidae*). Middle-East Journal of Scientific Research. 2013;13:64-8. https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.13.1.64107

52. **Vera SS, Zambrano DF, Méndez-Sánchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko EE, Luna JE.** Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). Parasitol Res. 2014;113:2647-54. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3917-6

53. **Govindarajan M.** Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species. Asian Pac J Trop Med. 2010;3:874-7. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60210-6

54. **Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswary M, Veerakumar K.** Mosquito larvicidal activity of timol from essential oil of *Coleus aromaticus* Benth. against *Culex tritaeniorhynchus, Aedes albopictus*, and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2013;112:3713-21. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3557-2

55. **Ali A, Wang YH, Khan IA.** Larvicidal and biting deterrent activity of essential oils of *Curcuma longa*, ar-turmerone, and curcuminoids against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae: Diptera). J Med Entomol. 2015;52:979-86. https://doi.org/10.1093/jme/tjv072

56. **Giatropoulos A, Pitarokili D, Papaioannou F, Papachristos DP, Koliopoulos G, Emmanouel N, *et al*.** Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight Cupressaceae species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2013;112:1113-1123. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3239-5

57. **Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST.** Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. Bioresour Technol. 2009;100:452-6. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.038

58. **Lucía A, González-Audino P, Seccacini, E, Licastro S, Zerba E, Masuh H.** Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23: 299-303. https://doi.org/10.2987/8756-971X(2007)23[299:LEOEGE]2.0.CO;2

59. **Lucía A, Licastro S, Zerba E, Masuh H.** Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. Entomol Exp Appl. 2008;129:107-14. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00757.x

60. **Intirach J, Junkum A, Tuetun B, Choochote W, Chaithong U, Jitpakdi A, *et al*.** Chemical constituents and combined larvicidal effects of selected essential oils against *Anopheles cracens* (Diptera: *Culicidae*). Psyche. 2012;2012:1-11. https://doi.org/10.1155/2012/591616

61. **Rocha DK, Matosc O, Novoa MT, Figueiredo AC, Delgado M, Moiteiro C.** Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* essential oils from Portugal and Cape Verde. Nat Prod Commun. 2015;10:677-82.

62. **Aciole SD, Piccoli CF, Costa EV, Navarro-Silva MA, Márques FA, Sales-Maia BH, *et al*.** Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). Revista Colombiana de Entomología. 2011;37:262-8.

63. **Liu XC, Liu QY, Zhou L, Liu ZL.** Larvicidal activity of essential oil derived from *Illicium henryi* Diels (Illiciaceae) Leaf. Trop J Pharm Res. 2015;14:111-6. https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i1.16

64. **Tabanca N, Avonto C, Wang M, Parcher JF, Ali A, Demirci B, *et al*.** Comparative investigation of *Umbellularia californica* and *Laurus nobilis* leaf essential oils and identification of constituents active against *Aedes aegypti*. J Agric Food Chem. 2013;61:12283-91. https://doi.org/10.1021/jf4052682

65. **Silva WJ, Dória GA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, *et al*.** Effects of essential oils on *Aedes aegyp*ti larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource Technol. 2008;99:3251-5. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.064

66. **Gleiser RM, Zygadlo JA.** Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (*Verbenaceae*) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*). Parasitol Res. 2007;101:1349-54. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0647-z

67. **Lima GP, de Souza TM, de Paula Freire G, Farias DF, Cunha AP, Ricardo NM, *et al*.** Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti L.* Parasitol Res. 2013;112:1953-8. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3351-1

68. **Koliopoulos G, Pitarokili D, Kioulos E, Michaelakis A, Tzakou O.** Chemical composition and larvicidal evaluation of Mentha, Salvia, and Melissa essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. Parasitol Res. 2010;107: 327-35. https://doi.org/10.1007/s00436-010-1865-3

69. **Lima TC, da Silva TK, Silva FL, Barbosa-Filho JM, Marques MO, Santos RL, *et al*.** Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. Chemosphere. 2014;104:37-43. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.035

70. **Raj GA, Chandrasekaran M, Krishnamoorthy S, Jayaraman M, Venkatesalu V.** Phytochemical profile and larvicidal properties of seed essential oil from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*). Parasitol Res. 2015;114:3385-91. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4563-3

71. **Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswary M, Yogalakshmi K.** Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). Exp Parasitol. 2013;134:7-11. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.018

72. **Kulkarni RR, Pawar PV, Joseph MP, Akulwad AK, Sen A, Joshi SP.** *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: Chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti, Anopheles sfttephensi* and *Culex quinquefasciatus*. J Pest Sci. 2013;86:713-8. https://doi.org/10.1007/s10340-013-0502-1

73. **Pavela R.** Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. J Asia-Pacific Entomol. 2014;17:287-93. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.02.001

74. **Koutsaviti K, Giatropoulos A, Pitarokili D, Papachristos D, Michaelakis A, Tzakou O.** Greek *Pinus* essential oils: Larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2015;114:583-92. https://doi.org/10.1007/s00436-014-4220-2

75. **Gokulakrishnan J, Kuppusamy E, Shanmugam D, Appavu A, Kaliyamoorthi K.** Pupicidal and repellent activities of *Pogostemon cablin* essential oil chemical compounds against medically important human vector mosquitoes. Asian Pac J Trop Dis. 2013;3:26-31. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60006-7

76. **Maheswaran R, Ignacimuthu S.** Bioefficacy of essential oil from *Polygonum hydropiper* L. against mosquitoes, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. Ecotoxicol Environ Saf. 2013;97:26-31. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.028

77. **Conti B, Leonardi M, Pistelli L, Profeti R, Ouerghemmi I, Benelli G.** Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L.(*Rutaceae*) against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: *Culicidae*), an arbovirus vector. Parasitol Res. 2013;112:991-9. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3221-2

78. **López LAP, Yael C, Cirio AT.** Essential oils from *Zanthoxylum fagara* Wild Lime, *Ruta chalepensis* L. and *Thymus vulgaris L.*: Composition and activity against *Aedes aegypti* larvae. Pak J Pharm Sci. 2015;28:1911-5.

79. **Ali A, Demirci B, Kiyan HT, Bernier UR, Tsikolia M, Wedge DE, *et al*.** Biting deterrence, repellency, and larvicidal activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: *Rutaceae*) essential oil and its major individual constituents against mosquitoes. J Med Entomol. 2013;50:1267-74. https://doi.org/10.1603/ME12177

80. **Mathew J, Thoppil JE.** Chemical composition and mosquito larvicidal activities of *Salvia* essential oils. Pharm Biol. 2011; 49:456-63. https://doi.org/10.3109/13880209.2010.523427

81. **Pavela R.** Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Ind Crops Prod. 2009;30:311-5. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.06.005

82. **Aguiar RW, dos Santos SF, da Silva Morgado F, Ascencio SD, de Mendonça Lopes M, Viana KF, *et al*.** Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl.(*Negramina*) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. PloS One. 2015;10:e0116765. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116765

83. **Barbosa JD, Silva VB, Alves PB, Gumina G, Santos RL, Sousa DP, *et al*.** Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. Pest Manag Sci. 2012;68:1478-83. https://doi.org/10.1002/ps.3331

84. **Marques MM, Morais SM, Vieira ÍG, Vieira MG, Silva AR, De Almeida RR, *et al*.** Larvicidal activity of *Tagetes erecta* against *Aedes aegypti*. J Am Mosq Control Assoc. 2011;27:156-8. https://doi.org/10.2987/10-6056.1

85. **Ruiz C, Cachay M, Domínguez M, Velásquez C, Espinoza G, Ventosilla P, *et al*.** Chemical composition, antioxidant and mosquito larvicidal activities of essential oils from *Tagetes filifolia, Tagetes minuta* and *Tagetes elliptica* from Perú. Planta Med. 2011;77:PE30. https://doi.org/10.1055/s-0031-1282361

86. **Liu XC, Liu Q, Chen XB, Zhou L, Liu ZL.** Larvicidal activity of the essential oil from *Tetradium glabrifolium* fruits and its constituents against *Aedes albopictus*. Pest Manag Sci. 2015;71:1582-6. https://doi.org/10.1002/ps.3964

87. **Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C.** Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytother Res. 2005;19:303-9. https://doi.org/10.1002/ptr.1637

88. **Gillij YG, Gleiser RM, Zygadlo JA.** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Bioresour Technol. 2008;99:2507-15. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.066

89. **Moore SJ, Hill N, Ruiz C, Cameron MM.** Field evaluation of traditionally used plant-based insect repellents and fumigants against the malaria vector *Anopheles darlingi* in Riberalta, Bolivian Amazon. J Med Entomol. 2007;44:624-30. https://doi.org/10.1093/jmedent/44.4.624

90. **de Paula JP, Gomes-Carneiro M, Paumgartten FJ.** Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. J Ethnopharmacol. 2003;88:253-60. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00233-2

91. **Jaenson TG, Pålsson K, Borg-Karlson AK.** Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. J Med Entomol. 2006;43:113-9. https://doi.org/10.1093/jmedent/43.1.113

92. **Phasomkusolsil S, Soonwera M.** Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Asian Pac J Trop Biomed. 2011;1: S113-8. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60136-6

93. **Amer A, Mehlhorn H.** Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. Parasitol Res. 2006;99:478-90. https://doi.org/10.1007/s00436-006-0184-1

94. **Waliwitiya R, Kennedy CJ, Lowenberger CA.** Larvicidal and oviposition–altering activity of monoterpenoids, trans-anithole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Pest Manag Sci. 2009; 65:241-8. https://doi.org/10.1002/ps.1675

95. **Pavela R.** Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. Parasitol Res. 2015;114:3835-53. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4614-9

96. **Sousa RMO, Rosa JS, Silva CA, Almeida MTM, Novo MT, Cunha AC, *et al*.** Larvicidal, molluscicidal and nematicidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. J Pest Sci. 2015;88:413-26. https://doi.org/10.1007/s10340-014-0628-9

97. **Pavela R.** Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. Ind Crops Prod. 2015;76: 174-187. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015. 06.050

98. **Rana IS, Rana AS.** Efficacy of essential oils of aromatic plants as larvicide for the management of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) with special reference to *Foeniculum vulgare*. Asian Pac J Trop Dis. 2012;2:184-9. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60044-9

99. **Santos SR, Silva VB, Melo MA, Barbosa JD, Santos RL, de Sousa DP, *et al*.** Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010;10:1049-54. https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0158

100. **Gokulakrishnan J, Kuppusamy E, Shanmugam D, Appavu A, Kaliyamoorthi K.** Pupicidal and repellent activi-ties of *Pogostemon cablin* essential oil chemical compounds against medically important human vector mosquitoes. Asian Pac J Trop Dis. 2013;3:26-31. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60006-7

101. **Ali A, Tabanca N, Ozek G, Ozek T, Aytac Z, Bernier UR, *et al*.** Essential oils of *Echinophora lamondiana* (apiales: Umbelliferae): A relationship between chemical profile and biting deterrence and larvicidal activity against mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2015;52:93-100. https://doi.org/10.1093/jme/tju014

102. **Dória GA, Silva WJ, Carvalho GA, Alves PB, Cavalcanti SC.** A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. Pharm Biol. 2010;48:615-20. https://doi.org/10.3109/13880200903222952

103. **Radwan MA, El-Zemity SR, Mohamed SA, Sherby SM.** Larvicidal activity of some essential oils, monoterpenoids and their corresponding N-metil carbamate derivatives against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Int J Trop Ins Sci. 2008;28:61-8. https://doi.org/10.1017/S1742758408962366

104. **Cheng SS, Chua MT, Chang EH, Huang CG, Chen WJ, Chang ST.** Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. Bioresource Technol. 2009;100:465-70. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.060

105. **Lucía A, Zerba E, Masuh H.** Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. Parasitol Res. 2013;112:4267-72. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3618-6

106. **Perumalsamy H, Kim NJ, Ahn, AJ.** Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens* pallens, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2009;46:1420-3. https://doi.org/10.1603/033.046.0624

107. **Liu ZL, He Q, Chu SS, Wang CF, Du SS, Deng ZW.** Essential oil composition and larvicidal activity of *Saussurea lappa* roots against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2012;110:2125-30. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2738-0

108. **Kaufman PE, Mann RS, Butler JF.** Evaluation of semiochemical toxicity to *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* and *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae). Pest Manag Sci. 2010;66:497-504. https://doi.org/10.1002/ps.1899

109. **Liu XC, Dong HW, Zhou L, Du SS, Liu ZL.** Essential oil composition and larvicidal activity of *Toddalia asiatica* roots against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2013;112:1197-203. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3251-9

110. **Ali A, Murphy CC, Demirci B, Wedge DE, Sampson BJ, Khan IA, *et al*.** Insecticidal and biting deterrent activity of rose-scented geranium (*Pelargonium* spp.) essential oils and individual compounds against *Stephanitis pyrioides* and *Aedes aegypti*. Pest Manag Sci. 2013;69:1385-92. https://doi.org/10.1002/ps.3518

111. **Lahlou M.** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Res. 2004;18:435-48. https://doi.org/10.1002/ptr.1465

112. **Shaalan EAS, Canyon D, Younes MW, Abdel-Wahab H, Mansour AH.** A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environ Int. 2005;31:1149-66. https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.03.003

113. **Pavela R.** Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compounds on the house fly (*Musca domestica* L.). J Essent Oil Bear Pl. 2008;11:451-9. https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643653

114. **Koul O, Singh R, Kaur B, Kanda D.** Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. Ind Crops Prod. 2013;49:428-36. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.032

115. **Hummelbrunner LA, Isman MB.** Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). J Agricul Food Chem. 2001;49:715-20. https://doi.org/10.1021/jf000749t

116. **Liu CH, Mishra AK, Tan RX, Tang C, Yang H, Shen YF.** Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum alcanfora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. Bioresour Technol. 2006;97:1969-73. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.002

117. **Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E.** Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. Pest Manag Sci. 2002;58:1101-6. https://doi.org/10.1002/ps.548

118. **Wang Z, Kim JR, Wang M, Shu S, Ahn YJ.** Larvicidal activity of *Cnidium monnieri* fruit coumarins and structurally related compounds against insecticide-susceptible and insecticide-resistant *Culex pipiens* pallens and *Aedes aegypti*. Pest Manag Sci. 2012;68:1041-7. https://doi.org/10.1002/ps.3265

119. **Scotti L, Scotti MT, Silva VB, Santos SR, Cavalcanti SC, Mendonca FJ Jr.** Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. Med Chem. 2014;10:201-10. https://doi.org/10.2174/1573406411309990005

120. **Lee S, Peterson CJ, Coats JR.** Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. J Stored Prod Res. 2003;39:77-85. https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00020-6

121. **García M, Donadel OJ, Ardanaz CE, Tonn CE, Sosa ME.** Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. Pest Manag Sci. 2005;61:612-8. https://doi.org/10.1002/ps.1028

122. **López Ó, Fernández-Bolaños JG, Gil MV.** New trends in pest control: The search for greener insecticides. Green Chem. 2005;7:431-42. https://doi.org/10.1039/B500733J

123. **Santos SR, Melo MA, Cardoso AV, Santos RL, de Sousa DP, Cavalcanti SC.** Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. Chemosphere. 2011;84:150-3. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.018

124. **Abdelgaleil SA, Mohamed MI, Badawy ME, El-arami SA.** Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. J Chem Ecol. 2009;35:518-25. https://doi.org/10.1007/s10886-009-9635-3

125. **Andrade-Ochoa S, Nevárez-Moorillón GV, Sánchez-Torres LE, Villanueva-García M, Sánchez-Ramírez BE, Rodríguez-Valdez LM, *et al*.** Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis.* BMC Comp Alt Med. 2015;15:332. https://doi.org/10.1186/s12906-015-0858-2

126. **Lomonaco D, Santiago GM, Ferreira YS, Arriaga ÂM, Mazzetto SE, Mele G, *et al*.** Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. Green Chem. 2009;11:31-3. https://doi.org/10.1039/B811504D

127. **Wang Z, Song J, Chen J, Song Z, Shang S, Jiang Z, *et al*.** QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring. Bioorg Med Chem Lett. 2008;18:2854-9. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.091

128. **Begum NA, Roy N, Laskar RA, Roy K.** Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: Structure–activity relationship analysis. Med Chem Res. 2011;20:184-91. https://doi.org/10.1007/s00044-010-9305-6

129. **Ma D, Bhattacharjee AK, Gupta RK, Karle JM.** Predicting mosquito repellent potency of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) analogs from molecular electronic properties. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:1-6.

130. **Paluch G, Grodnitzky J, Bartholomay L, Coats J.** Quantitative structure−activity relationship of botanical sesquiterpenes: Spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. J Agric Food Chem. 2009;57:7618-25. https://doi.org/10.1021/jf900964e

131. **Rattan RS.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop Protection. 2010;29:913-20. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008

132. **Isman MB.** Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. 2000;19:603-8. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008

133. **Zarrad K, Hamouda AB, Chaieb I, Laarif A, Jemâa JM.** Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. Ind Crops Prod. 2015;76:121-7. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.039

134. **Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Natural Prod Rep. 2006;23:181-99. https://doi.org/10.1039/B508966M

135. **Jyotshna, Srivastava N, Singh B, Chanda D, Shanker K.** Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Artemisia maderaspatana* essential oil. Pharm Biol. 2015;53:1677-83. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1001405

136. **Enan EE.** Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2001;130:325e337. https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00255-1

137. **Coats R, Karr LL, Drewes CD.** Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. En: Hedin P, editor. Natural occurring pest bioregulators. Washington, D.C.: American Chemical Society; 1991. p. 305-16.

138. **Ryan MF, Byrne O.** Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. J Chem Ecol.1988;14:1965-75. https://doi.org/10.1007/BF01013489

139. **Praveena A, Sanjayan KP.** Inhibition of acetylcholinesterase in three insects of economic importance by linalol, a monoterpene phytochemical. En: Ambrose DP, editor. Insect pest management, a current scenario, entomology research unit. Palayamkottai, India: St. Xavier's College; 2011. p. 340-5.

140. **Felipe CF, Fonsêca KS, dos Reis Barbosa AL, Bezerra JN, Neto MA, de França Fonteles MM, *et al*.** Alterations in behavior and memory induced by the essential oil of *Zingiber officinale Roscoe* (ginger) in mice are cholinergic-dependent. J Med Plants Res. 2008;2:163-70.

141. **Yeom HJ, Kang JS, Kim GH, Park IK.** Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). J Agric Food Chem. 2012;60:7194-203. https://doi.org/10.1021/jf505927n

142. **Kim SW, Kang J, Park IK.** Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. J Asia-Pacific Entomol. 2013;16:443-8. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.07.002

143. **Seo SM, Jung CS, Kang J, Lee HR, Kim SW, Hyun J, *et al*.** Larvicidal and acetylcholine esterase inhibitory activity of apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus*, and formulation development. J Agric Food Chem. 2015;63:9977-86. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03586

144. **Yeom HJ, Jung CS, Kang J, Kim J, Lee JH, Kim DS, *et al*.** Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of asteraceae plant essential oils and their constituents against adults of the German cockroach (*Blattella germanica*). J Agric Food Chem. 2015;63:2241-8. https://doi.org/10.1021/jf505927n

145. **Khanikor B, Parida P, Yadav RNS, Bora D.** Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and docking studies. J Appl Pharm Sci. 2013;3:6-12. https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.30202

146. **Unnithan AR.** *In vitro* sensitivity assay of *Lantana camara* against *Aedes agypti* with supplementary facts from GC MS and *in silico* analysis. J Biomed Pharm Sci. 2015;4:5-9.

147. **Enan EE.** Molecular and pharmacological analysis of an octopamina receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. Arch Insect Biochem Physiol. 2005;59:161-71. https://doi.org/10.1002/arch.20076

148. **Enan EE.** Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35:309-21. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.12.007

149. **Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB.** Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. Br J Pharmacol. 2003;140:1363-72. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705542

150. **Bloomquist JR, Boina DR, Chow E, Carlier PR, Reina M, González-Coloma A.** Mode of action of the plant-derived silphinenes on insect and mammalian GABA A receptor/chloride channel complex. Pest Biochem Physiol. 2008;91:17-23. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.12.002

151. **Höld KM, Sirisoma NS, Ikeda T, Narahashi T, Casida JE.** α-Thujone (the active component of absinthe): γ-Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. Proc Natl Acad Sci. 2000;97:3826-31. https://doi.org/10.1073/pnas.070042397

152. **Kumar PS, Chezhian A, Raja PS, Sathiyapriya J.** Computational selections of terpenes present in the plant *Calotropis gigantea* as mosquito larvicide's by blocking the sterol carrying protein, AeSCP-2. Bangladesh J Pharmacol. 2012;7:1-5. https://doi.org/10.3329/bjp.v7i1.8414