



**INFECCIÓN DE *Anopheles* spp POR *Plasmodium* spp Y SU
IMPORTANCIA EN LA TRANSMISIÓN DE MALARIA EN COMUNIDADES
INDÍGENAS DEL AMAZONAS COLOMBIANO**

**Investigador
LUIS ANTONIO ALVARADO CABRERA**

**Directora del trabajo de Investigación
Sandra Milena Camargo Pinzón, MSc. Dr. Sc(c)
Investigadora FIDIC**

**Coinvestigador
Manuel Alfonso Patarroyo
Profesor Titular Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad del Rosario**

**Asesor Metodológico
Giovanni Antonio Rodríguez Leguizamón. MD. Dr. Sc
Universidad del Rosario**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
UNIVERSIDAD CES
Facultad de Medicina**

**Maestría en Epidemiología
Bogotá, Septiembre de 2019**



**INFECCIÓN DE *Anopheles* spp POR *Plasmodiums* spp Y SU
IMPORTANCIA EN LA TRANSMISIÓN DE MALARIA EN COMUNIDADES
INDÍGENAS DEL AMAZONAS COLOMBIANO**

Investigador

LUIS ANTONIO ALVARADO CABRERA, B.Sc.

Directora del trabajo de Investigación

Sandra Milena Camargo Pinzón, MSc. Dr. Sc(c)

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD CES

Facultad de Medicina

**Trabajo de investigación para optar al título de
MAGÍSTER EN EPIDEMIOLOGÍA**

Bogotá, Septiembre de 2019

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“Las Universidades del Rosario y CES no se hacen responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	15
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
1.2. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA.....	17
1.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
2. MARCO TEÓRICO	22
2.1. EPIDEMIOLOGIA DE LA MALARIA.....	22
2.2. LA MALARIA EN EL AMAZONAS.....	23
2.3. BIOLOGIA Y ECOLOGÍA DE <i>ANOPHELES SPP</i>	25
2.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>ANOPHELES SPP</i>	29
2.5.1. TAXONOMÍA CONVENCIONAL	30
2.5.2. MÉTODOS MOLECULARES	36
2.5.2.1. DNA BARCODING.....	36
2.6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE <i>PLASMODIUM SPP</i> EN MOSQUITOS 38	
2.6.1. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.....	39
2.6.1.1. ELISA.....	39
2.6.1.2. REACCIÓN DE LA CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	41
3. HIPÓTESIS.....	44
3.1. HIPOTESIS CONCEPTUAL	44
3.2. HIPÓTESIS OPERACIONAL ALTERNA.....	44
3.3. HIPÓTESIS OPERACIONAL NULA.....	44
4. OBJETIVO	45
4.1. GENERAL	45
4.2. ESPECÍFICOS	45
5. METODOLOGÍA.....	46
5.1. ENFOQUE METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	46

5.2. TIPO DE ESTUDIO	46
5.3. POBLACIÓN	46
5.4. DISEÑO MUESTREAL	46
5.4.1. CAPTURA, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE	49
5.4.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE MOSQUITOS	50
5.4.3. ANALISIS EVOLUTIVOS DEL GEN COI	51
5.4.4. DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>PLASMODIUM</i> E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE	51
5.4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
6. CONSIDERACIONES ÉTICAS	54
7. RESULTADOS	55
7.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES DE MOSQUITOS Y ANALISIS DNA BARCODE	55
7.2. VARIACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE MOSQUITOS DE ACUERDO CON EL ÁREA DE ESTUDIO	56
7.3. ABUNDANCIA Y TASA DE PICADURA DE <i>AN. DARLINGI</i> EN LAS ÁREAS MUESTREADAS	63
7.4. INFECCIÓN NATURAL Y DETECCIÓN DE ESPECIES DE <i>PLASMODIUM</i>	64
8. DISCUSIÓN	70
10. BIBLIOGRAFIA	77
11. ANEXOS	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Objetivos, hitos y metas de la estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030.	18
Tabla 2. Descripción de la detección de plasmodium en mosquito.....	42
Tabla 3. Estimadores de Diversidad Genética	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dorsal de un Culicinae.....	30
Figura 2. Diferencias morfológicas de las Subfamilias de Anophelinae y Culicinae.	31
Figura 3. A. Vista dorsal del toráx de <i>Anopheles</i> . B. Vista lateral de Toráx de <i>Anopheles</i>	32
Figura 4. Explicación de la nomenclatura de Ala de <i>Anopheles</i> (<i>Nyssorhynchus</i>)	33
Figura 5. Pata posterior de <i>Anopheles</i>	34
Figura 6. Representación gráfica de las patas posteriores de <i>An. darlingi</i>	35
Figura 7. Esquema de ala de <i>An. darlingi</i>	35
Figura 8. Representación gráfica de las patas posteriores de <i>An. mattogrossensis</i>	35
Figura 9. Esquema de ala de <i>An. mattogrossensis</i>	36
Figura 10. Mapa de ubicación de las comunidades de muestreo.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica 1. Número de casos de Malaria en el Departamento de Amazonas 2011 – 2017. Tomado de SIVIGILA. 2011-2017	47
Gráfica 2. Mapa de ubicación de las comunidades de muestreo.	49
Gráfica 3. Flujograma de la metodología aplicada	53
Gráfica 4. Número total de especies capturadas por lugar muestreado.....	55
Gráfica 5. Porcentaje de mosquitos por sitio de captura	56
Gráfica 6. Porcentaje de moquitos de cada ecotopo por cada lugar muestreado	57
Gráfica 7. Número total de mosquitos capturados en Tipisca 1 (Tp1). Las barras muestran el número total de mosquitos capturados en cada hora de muestreo, mientras que las líneas corresponden a la cantidad de moquitos capturados en cada ecotopo.	57
Gráfica 8. Media de mosquitos capturados por hora de cada una de los sitios de captura. Con su respectiva Desviación estándar.	58
Gráfica 9. Media de mosquitos capturados por hora de cada los lugares muestreados. Con su respectiva desviación estándar.	59
Gráfica 10. Media de mosquitos capturas por hora por cada hora de muestreo. Con su respectiva desviación estándar.....	59
Gráfica 11. Media de mosquitos capturados por hora de cada uno de los lugares muestreados. Con su respectiva desviación estándar.....	60
Gráfica 12. Media de mosquitos capturados por hora de cada uno sitios capturados. Con su respectiva desviación estándar.	60
Gráfica 13. Número total de mosquitos capturados en Tipisca 2 (Tp2). Las barras muestran el número total de mosquitos capturados en cada hora de muestreo, mientras que las líneas corresponden a la cantidad de moquitos capturados en cada ecotopo.	61
Gráfica 14. Media número de mosquitos de acuerdo al ecotopo y a la hora de muestreo. Las barras muestran la media total de mosquitos de acuerdo con el	

la hora de muestreo, mientras que las líneas muestran la media de mosquitos por ecotopo muestreado. 62

Gráfica 15. Número total de mosquitos capturados en Doce de Octubre (DO). Las barras muestran el número total de mosquitos capturados en cada hora de muestreo, mientras que las líneas corresponden a la cantidad de moquitos capturados en cada ecotopo. 63

Gráfica 16. Frecuencia relativa de infección por *Plasmodium spp* por comunidad muestreada. 65

Gráfica 17. Frecuencia relativa de *Plasmodium spp*, por ecotopo de muestreo. 66

Gráfica 18. Frecuencia de muestras de pools con presencia una, dos, y tres especies de Parásitos. 67

Gráfica 19. Median joining network. La gráfica muestra los haplotipos de COI identificados para los mosquitos recolectados en el amazonas colombiano, algunos haplotipos fueron incluidos dentro de otros haplotipos usando el algoritmo Contraction Star (125). para simplificar la interpretación de la red, cada nodo es un haplotipo y el tamaño de este indica la frecuencia. Las líneas conectan los haplotipos representativos, las diferentes rutas mutacionales, los median vectores son las secuencias ancestrales que explican la relación y el origen evolutivo. 69

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Socialización convenio 022 entre Instituto Colombiano de Inmunología (FIDIC) y la Gobernación del Amazonas	92
ANEXO 2. Comité de Investigaciones Éticas (CEI) (Colombia: resolución CEI-ABN 026-0001061	92
ANEXO 3. Acta No. 12 del 15 de noviembre de 2018 del Comité Institucional para la Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad de la Universidad CES (Comité de Ética de la Biodiversidad)	95
ANEXO 4. Acta No. 99 del 29 de enero de 2019 del Comité Institucional de Ética de investigación en Humanos Universidad CES	97
ANEXO 5. Consentimiento informado aceptado por el Comité de Ética de la Universidad CES	100
ANEXO 6. Consentimiento informado firmado por los participantes del proyecto	104
Anexo 7. Artículo generado y publicado en este estudio.....	112

RESUMEN

Introducción: La distribución de las especies de *Plasmodium* han variado en las comunidades del Amazonas Colombiano, siendo *P. vivax* y *P. malariae* las de mayor frecuencia. Esto se debe a factores ambientales (como el cambio climático) y sociales (desplazamiento de la población) los cuales han impactado en la ecología y comportamiento de los vectores, ocasionando cambios en la dispersión parasitaria y la aparición de brotes en áreas donde se consideraba controlada.

Objetivos: Identificar las especies de anophelinos a nivel taxonómico y molecular en dos comunidades del Amazonas Colombiano, Tipisca (Tp1/Tp2) y Doce de Octubre (DO) y determinar la frecuencia de infección de *P. vivax*, *P. malariae* y *P. falciparum*.

Metodología: El estudio se realizó en junio de 2016 en dos comunidades indígenas ubicadas en un afluente del río Amazonas, fueron capturados mosquitos de 6 pm a 11 pm en tres ecotopos (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio), por el método de cebo humano protegido. Fue realizada la identificación taxonómica morfológica y luego fue confirmada con Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de un fragmento del gen *Mitocondrial Citocromo C Oxidasa Subunidad I (COI)*. La identificación de las tres especies de *Plasmodium* se realizó una PCR en 224 pooles analizados.

Resultados: Se colectaron 1086 individuos; el 99,2% (n=1057) correspondió a *Anopheles darlingi*, el 0,4% *An. mattogrossensis* (n=4) y el 0,4% *Culex* spp (n=4). Los resultados mostraron que Tp1 tuvo la mayor abundancia de mosquitos (media=26,3), seguido por Tp2 (media=23,2) y DO (media=6,4), un análisis de varianzas reveló diferencias significativas entre el Tp1 y DO ($p=0,001$) y Tp2 y DO ($p=0,001$). A nivel de ecotopo la tasa de picadura más alta ocurrió en el peridomicilio (media=31,0), seguido del extradomicilio (media=26,6) y el intradomicilio (media=1,1), diferencias significativas se hallaron en el peridomicilio ($p=0,004$) y extradomicilio ($P=0,004$). De los 224 pooles analizados en el 40,6% se detectó *Plasmodium*; siendo *P. vivax* la más prevalente (21,9%), seguida de *P. malariae* (21,0%) y *P. falciparum* (10,3%). En cuanto a las infecciones mixtas, 24 (26,4%) de ellos presentaron infección por más de una especie parasitaria, siendo *P. vivax* y *P. malariae* (n=15; 16,5%) la de mayor aparición. Para *An. mattogrossensis* se encontró solo *P. vivax* en el 50% de los especímenes, siendo el primer registro de infección para esta especie en Colombia.

Discusión: *An. darlingi* fue la especie dominante en la zona en una época de alta transmisión. Los resultados siguieron una actividad antropofílica y exofágica, lo que indica un cambio comportamental de su alimentación en las zona de estudio; su alta abundancia y susceptibilidad a la infección por *Plasmodium* indican su relación en la transmisión parasitaria como un vector primario. Se encontraron altas frecuencias de las especies parasitarias, demostrando la utilidad del uso de técnicas moleculares en la identificación del parásito. Los resultados de esta investigación buscan aportar información que

a futuro contribuya al mejoramiento y la innovación de estrategias dirigidas al control de los vectores, como un paso esencial en el diseño de estrategias de prevención y control de la malaria.

ABSTRACT

Introduction: The distribution of *Plasmodium* species has varied in the communities of the Colombian Amazon, with *P. vivax* and *P. malariae* being the most frequent. This is due to environmental factors (such as climate change) and social factors (such as population displacement) which have impacted on the ecology and behavior of these vectors, causing changes in parasitic dispersion and the appearance of outbreaks in areas where it was considered controlled.

Objectives: To identify the species of anophelin at a taxonomic and molecular level in two communities of the Colombian Amazon, Tipisca (Tp1 / Tp2) and Doce de Octubre (DO) and to determine the frequency of infection of *P. vivax*, *P. malariae* and *P. falciparum*.

Methodology: The study was conducted in two indigenous communities located on a tributary of the Amazon River, where mosquitoes were captured from 6 pm to 11 pm in three ecotopes (intradomiciliary, peridomiciliary and extradomiciliary), by the method of human bait protected in June 2016. The morphological taxonomic identification was performed and then confirmed with a Polymerase Chain Reaction (PCR) of a fragment of the Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I (IOC) gene. The identification of the three *Plasmodium* species was performed by a PCR in 224 pools analyzed.

Results: 1086 individuals were collected; 99.2% (n = 1057) corresponded to *Anopheles darlingi*, 0.4% *An. mattogrossensis* (n = 4) and 0.4% *Culex spp* (n = 4). The results showed that Tp1 had the highest abundance of mosquitoes (mean = 26.3), followed by Tp2 (mean = 23.2) and OD (mean = 6.4), an analysis of variances revealed significant differences between Tp1 and OD (p = 0.001) and Tp2 and OD (p = 0.001). At the ecotope level, the highest bite rate occurred in the peridomiciliary (mean = 31.0), followed by the extradomiciliary (mean = 26.6) and the intradomiciliary (mean = 1.1), significant differences were found in the peridomiciliary (p = 0.004) and extradomiciliary (P = 0.004). Of the 224 pools analyzed in 40.6%, *Plasmodium* was detected; *P. vivax* being the most prevalent (21.9%), followed by *P. malariae* (21.0%) and *P. falciparum* (10.3%). As for mixed infections, 24 (26.4%) of them presented infection by more than one parasitic species, with *P. vivax* and *P. malariae* (n = 15; 16.5%) being the most common. For *An. mattogrossensis*, only *P. vivax* was found in 50% of the specimens, being the first infection record for this species in Colombia.

Discussion: *An. darlingi* was the dominant species in the area at the time of high transmission. The results follow an anthropophilic and exophagial activity,

which indicates a behavioral change of their diet in the study area; Its high abundance and susceptibility to *Plasmodium* infection indicate its relationship in parasitic transmission as a primary vector. High frequencies of the parasitic species were found, demonstrating the usefulness of the use of molecular techniques in the identification of the parasite. The results of this research seek to provide information that supports the improvement and innovation of strategies aimed at vector control, as an essential step in the design of malaria prevention and control strategies.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es una enfermedad transmitida por vectores, de mayor distribución en países tropicales y subtropicales y potencialmente mortal. Su transmisión se presenta en las áreas tropicales de África, Asia y América Latina, donde afecta principalmente a la población en condiciones de vulnerabilidad como el bajo nivel económico, falta de acceso a servicios de salud, entre otros (1,2).

Para el 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 219 millones de casos en todo el mundo, presentando un aumento de 2 millones de casos comparado con reportes de años anteriores, el 90% de los casos fueron notificados en la región de África, seguido del Sur-Este de Asia con el 7% y la región mediterránea con el 2% de los casos (2).

Para Sumeramérica, se presentó un descenso sostenido de los casos de malaria desde el año 2005 hasta el 2014, sin embargo, después del 2015 los países de La República Bolivariana de Venezuela, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guyana, Haití, Honduras y Nicaragua notificaron un aumento de casos (3).

Para Colombia en el año de 2018, se reportaron al Instituto Nacional de Salud 56.754 casos, de los cuales 881 corresponden a malaria complicada; los departamentos de mayor Índice Parasitario Anual (IPA) fueron Guainía (IPA: 72,3), Chocó (IPA: 30,9), Nariño (IPA: 27,8), y Amazonas (IPA: 25) (4).

En el control de la malaria, los programas se basan prioritariamente en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con infecciones por *Plasmodium* spp. (5–7). No obstante, las estrategias dirigidas a la prevención contribuyen significativamente en la reducción del riesgo de infección, estas se han realizado principalmente a través de la implementación del control vectorial, la protección personal contra la picada del mosquito, los toldillos impregnados de larga duración (TILD) y tratamiento preventivo intermitente (8).

Las estrategias más efectiva es el control vectorial que se basan en la aplicación de insecticidas principalmente en criaderos y en la disminución de las densidades de los mosquitos adultos mediante aspersion y rociamiento de viviendas con insecticidas (5,6). Para la aplicación de estas estrategias es necesario conocer las características biológicas y ecológicas de los mosquitos involucrados en la transmisión; estas características varían de acuerdo con las condiciones ambientales de cada zona, así como el comportamiento de picada depende de los hábitos de la población local (9).

Anopheles darlingi, es considerado como una de las especies de mayor abundancia en nuestro país, y uno de los más eficientes anofelinos en la transmisión de *Plasmodium spp* (9–11). En la amazonia colombiana se han llevado a cabo algunos estudios, uno de los cuales se realizó en tres localidades del trapecio amazónico, Leticia, Puerto Nariño y Tarapaca, donde se tomaron especímenes con la técnica de cebo humano protegido a nivel de tres ecotopos (intradomicilio, peridomicilio, extradomicilio), los resultados mostraron que al menos 7 especies de anopheles circulaban en las zonas muestreadas, siendo *An. darlingi* y *An. nuneztovari* las de mayor frecuencia, siendo *An. darlingi* la especie de mayor abundancia de (9).

Otro estudio llevado a cabo en otra localidad de Puerto Arica, reportó tres especies adultas de anopheles en los alrededores de las viviendas, en este estudio además no se encontró *An. darlingi* (12). No obstante, a pesar que se ha avanzado en el conocimiento de las especies circulantes en algunas comunidades de Amazonas, aún falta una mayor información para otras localidades donde se presentan importantes brotes de la enfermedad; adicionalmente se cuenta con escasa información de la presencia de *Plasmodium spp.* en las especies de mosquitos circulantes en el departamento.

Por otra parte, los casos de malaria en el Departamento de Amazonas han aumentado desde 2010 de una manera exponencial, en el año 2015 el municipio de Leticia y Puerto Nariño fueron los más afectados con más de 1,300 casos, reportados para cada municipio (13). Parte de este incremento se debe a las características particulares de la región del Amazonas, entre ellas las condiciones ambientales (como el nivel del agua, la precipitación, temperatura y la humedad relativa), factores sociales (como la densidad poblacional, el nivel de intervención ambiental, el tipo de actividades económicas de la comunidad, entre otras) y la elevada movilidad que presentan las personas entre las fronteras, contribuyen en la dispersión y transmisión de la malaria a que se disperse durante todo el año (14–16).

En los últimos años se ha reportado que factores como el cambio climático, ha conducido a un cambio en el funcionamiento de los ecosistemas y las especies que los integran, disminuyendo los tiempos del ciclo biológico de vectores y parásitos, y aumentando los casos de malaria hasta en un 6% (17,18), así como aumenta el rango de distribución de los vectores a zonas templadas y montañosas (19), colonizando así nuevos nichos ecológicos y provocando cambios en la frecuencia y distribución de los mosquitos y por lo tanto los parásitos. Este cambio climático se debe al efecto causado por actividades humanas como la deforestación, la pesca y la agricultura a gran escala, así como la quema de combustibles fósiles como el carbón, el petróleo y el gas, provocan incremento en la atmosfera de gases que causan efecto de invernadero (17).

Teniendo en cuenta el cambio en los ecosistemas y por ende su impacto en la distribución de los vectores y parásitos, resulta necesario generar estrategias de control para mitigar el impacto de la malaria, y el cambio de comportamiento de los mosquitos (por ejemplo la hora y lugar de picadura) (19,20). Estas herramientas de control deben ser basadas en la aceptación social y cultural de las población afectada, presentar un mínimo impacto ambiental, ser costo efectivas y sostenibles (20). Algunas de ellas van dirigidas a la reducción del contacto hombre – vector, la reducción de los criaderos de los vectores y métodos que contribuyan al aumento de la mortalidad de los vectores en estadios adultos (20).

Sin embargo, estas estrategias se basan en el conocimiento de la biología y bionomía de las especies involucradas en la transmisión (20). La falta de una correcta identificación de los vectores involucrados no permite direccionar una gestión integrada de control vectorial que logre disminuir los casos de malaria de una zona determinada. Además, se desconoce la tasa de infección y las especies de *Plasmodium* de las poblaciones de anophelinos. Lo que produce poblaciones de anophelinos que actúan como reservorios de *Plasmodium*, ya que las estrategias de control vectorial desconoce su importancia en la transmisión.

Este desconocimiento de la diversidad de especies de mosquitos circulantes en la Amazonía disminuye el impacto en las estrategias implementadas para el control de la malaria. Adicionalmente, se cuenta con poca información acerca de la frecuencia y distribución de las especies circulantes de *Plasmodium spp* en las poblaciones de anophelinos, lo anterior, aumenta el riesgo y la gravedad de las infecciones parasitarias y limita los resultados de los programas de prevención de la malaria.

1.2. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

Colombia en el año 2000, se comprometió, junto a 189 miembros de la Organización de las Naciones Unidas, a cumplir con los ocho Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM). En el objetivo seis, el compromiso es combatir el VIH/SIDA, el paludismo y otras enfermedades. El compromiso para malaria fue reducir los casos de mortalidad por malaria, teniendo como línea base el año de 1998 con 227 casos al año (21,22).

En 2014, el Ministerio de Salud, presentó los avances en el Monitoreo de los objetivos de desarrollo del milenio con corte a octubre, donde mostró una reducción del 71%, con un cumplimiento anticipado de la meta de las mortalidades por malaria con corte al año 2012 con 24 casos (23).

De acuerdo con lo anterior, el país se acoge a la Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030, donde se establecen nuevas metas a cumplir al año 2030 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Objetivos, hitos y metas de la estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030.

OBJETIVOS	HITOS		METAS
	2020	2025	2030
Reducir las tasas de mortalidad por malaria en todo el mundo en comparación con la de 2015	Por lo menos 40%	Por lo menos 75%	Por lo menos 90%
Reducir la incidencia de casos de malaria en todo el mundo en comparación con al de 2015	Por lo menos 40%	Por lo menos 75%	Por lo menos 90%
Eliminar la malaria ne los países en los que siga habiendo transmisión en 2015	Por lo menos 10 países	Por lo menos 20 países	Por lo menos 35 países
Evitar el restablecimiento de la malaria en todos los países exentos de la enfermedad	Restablecimiento evitado	Restablecimiento evitado	Restablecimiento evitado

Fuente: Estrategia técnica mundial contra la malaria, 2015 (7).

Además, la Estrategia Técnica Mundial Contra la Malaria 2017-2030, establece dentro del marco estratégico tres pilares fundamentales: lograr el acceso universal a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la malaria,

acelerar los esfuerzos para lograr la eliminación y alcanzar el estado exento de malaria y transformar la vigilancia malárica en una intervención básica. Estos se establecieron con el objetivo de acelerar el avance hacia la eliminación, maximizando los efectos de los instrumentos y estrategias existentes (6,7). Dentro de los tres pilares resaltan la importancia de la investigación básica en entomología y parasitología como elemento de apoyo, que resultará esencial para el conocimiento que permita obtener métodos de control con base en información basada en la evidencia científica (6,7).

Adicionalmente, se implementó el Plan decenal de salud 2012 – 2021, en el cual se propone reducir en un 80% la mortalidad por malaria de manera progresiva y sostenida (24). En atención a estos nuevos retos establecidos, Colombia, implementa las Rutas de Atención Integral (RIAS), que mediante la Resolución 3202 de 2016 se adoptó el Manual Metodológico para la elaboración e implementación de las RIAS (25,26). Este comprende el “conjunto de acciones coordinadas, complementarias y efectivas para garantizar el derecho a la salud, expresadas en políticas, planes, programas, proyectos, estrategias y servicios, que se materializan en atenciones dirigidas a las personas, familias y comunidades para la promoción de la salud, prevención de la enfermedad, diagnóstico, tratamiento, rehabilitación y cuidados paliativos”, garantizando las condiciones necesarias para la atención en salud (25,26). De las 16 rutas programadas, la número 8 se encuentra las RIAS para las enfermedades infecciosas, donde se encuentra malaria; estas se diseñaron para poder realizar un trabajo diferencial y adaptado a las realidades de cada zona del país (25).

Para cumplir con los objetivos planteados se debe tener en cuenta la diversidad de ambientes que se presentan en el país. Además, para ello el cambio climático resulta relevante ya que produce un cambio en el funcionamiento de los ecosistemas y las especies que los integran, (17,18), y aumenta el rango de distribución de los vectores a zonas más frías y montañosas (19).

La efectividad de las estrategias de control para la disminución del impacto de la malaria se basa en el conocimiento de la biología y ecología de los mosquitos involucrados en la transmisión en cada región del país (19,20). Para ello se debe actualizar constantemente la caracterización de la diversidad anophelina presente en las diferentes regiones, pues se ha observado que la presencia de otras especies de anophelinos, funcionan como reservorios para el parásito (27–30).

Además, en la región de la Amazonas colombiano se han identificado otras especies que han sido catalogadas como vectores potenciales, entre las que se encuentran *An. rangeli*, *An. oswaldoi* y *An. benarrochi*, las cuales han mostrado por pruebas de ELISA, infecciones por *Plasmodium* cercanas al 1%

(29), siendo esta una prevalencia baja de infecciones parasitarias, derivada de la técnica empleada para su detección, esto además sugiere la importancia de la implementación de técnicas mas sensibles como la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, de las siglas del inglés Polymerase Chain Reaction) en la identificación de *Plasmodium* en los anophelinos circulantes.

Por otra parte, desde el 2015, en el Amazonas colombiano, ha aumentado el registro de los casos de malaria; Se pasó de reportar 212 casos en 2011, 1385 casos en 2012 a 4194 casos en 2015 (13). La falta de conocimiento en las especies de mosquitos involucradas en la transmisión (29), el cambio de comportamiento en la alimentación por presión de las estrategias de control, el desconocimiento de las especies de *Plasmodium* circulantes en las poblaciones involucradas, así como por la alta movilidad de los pobladores a través de la frontera con Brasil y Perú (31), agravan el problema.

Para aportar en el entendimiento de la dinámica de transmisión de malaria en el Municipio de Puerto Nariño, en el Amazonas colombiano, se llevó a cabo un estudio de caracterización de las especies de anophelinos y de las especies de *Plasmodium* circulantes en una época de alta transmisión. La información derivada del presente proyecto permitirá recopilar datos de comportamiento de picadura, hábitos de reposo o alimentación entre otros datos biológicos y comportamentales de relevancia en la vigilancia entomológica.

Esta es una investigación en cooperación con el Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y la Gobernación del Amazonas (**ANEXOS**

ANEXO 1). Quienes buscan mejorar las condiciones de vida de la población del Amazonas mediante la investigación del conocimiento de los aspectos de la biología, la actividad de picadura y la dinámica de transmisión de las especies de *Plasmodium*, con la información generada se pretende contribuir en la definición de medidas de prevención y control de la malaria, permitiendo así la disminución de la incidencia de la malaria.

En este contexto, este proyecto brindó información con soporte científico de la abundancia y comportamiento del vector más eficiente de la malaria en Colombia, así como la frecuencia de tres especies de *Plasmodium* de alta circulación en esta región. La ejecución de este proyecto permitió la generación de información de la dinámica de la transmisión del parásito, permitiendo establecer relaciones ecológicas entre vector y parásito.

Finalmente, la evidencia científica de alto nivel se dispuso e informó en los programas de vigilancia y control de las ETVs, a nivel nacional y departamental, de manera tal que pueda representar una fuente de información para la generación de guías de atención integral de la malaria en el Amazonas, con foco especial en el vector, así como de sensibilización en la

población acerca de los factores ambientales que puedan estar vinculados en el desarrollo de la enfermedad y el re direccionamiento de los programas de vigilancia y control del vector.

1.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las especies de *Anopheles* spp. predominantes en las comunidades de Tipisca y Doce de Octubre localizadas en el Amazonas Colombiano?

¿Cuál es la frecuencia de *P. vivax*, *P. malariae* and *P. falciparum* en las poblaciones de *Anopheles* spp. en las comunidades de Tipisca y Doce de Octubre localizadas en e Amazonas Colombiano?

2. MARCO TEÓRICO

2.1. EPIDEMIOLOGIA DE LA MALARIA

La malaria se presenta en las áreas más pobres de la zona tropical, es considerada como la enfermedad transmitida por vectores más común y grave del mundo (1). Es endémica en 95 países y en pequeñas áreas de transmisión en ocho países más (2). El último reporte de la Organización Mundial de Salud (OMS), estimó que 219 millones de casos ocurrieron a nivel mundial, presentando un aumento de casos al compararlo con el año 2016 (2).

Para el año 2017, en la Región de África ocurrieron el 90% de los casos notificados, seguido del Sur-Este de Asia con el 7% y la región mediterránea con el 2% de los casos (2). En cuanto a muertes por malaria, con una alta mortalidad, se reportó por la OMS que en todo el mundo ocurrieron 435.000 muertes, una reducción de 16 mil muertes con respecto a 2016 y 172 mil con respecto a 2010 (2).

Para Suramérica, debido a la intensificación de las estrategias de prevención y control de toda la región de Latinoamérica, se logró realizar un descenso de los casos del año 2005 hasta el 2014; sin embargo entre los años 2015 a 2017 se notificaron un aumento de casos (3). Se reportaron 568.283 casos confirmados de malaria en 2016, 116 mil más que 2015 pero con una reducción del 16% con respecto a 2010 (32).

En Colombia igual que a nivel mundial la malaria representa un problema prioritario en salud pública debido a la transmisión con tendencia creciente en determinadas regiones del país, con un comportamiento cíclico epidémico que ocurren cada 2 a 7 años, relacionados con la ocurrencia del fenómeno del Niño-Oscilación Sur (33). La malaria es una enfermedad endémica en una gran parte del territorio nacional, en áreas localizadas por debajo de los 1.500 m.s.n.m. En el país aproximadamente 12 millones de personas habitan en zonas de riesgo de transmisión (34).

En el territorio colombiano se reconocen cuatro regiones como focos principales de transmisión de la malaria: el primero hacia el noreste la región comprendida entre el bajo cauca, el Sinu, Urabá, la segunda región es la costa Pacífica, el tercero hacia el oriente del país una parte de la Orinoquia; y cuarto hacia el sur, correspondiente a la región Amazonica (35). Para el año 2018 los departamentos de Guanía, Chocó, Nariño, Amazonas, Vichada, Vaupés y Guaviare fueron los de mayor notificación de casos de malaria (2).

Para nuestro país, en el año 2018 se registraron 56.754 casos de malaria (4), con un aumento del 3% con respecto a 2017 (55.117 casos de malaria) (36).

La especie *P. vivax* ha sido la especie más prevalente en la última década (37); sin embargo, desde el año 2014, se ha evidenciado un aumento en la notificación de casos de malaria por *P. falciparum*, donde los años de 2015 a 2017 la incidencia de *P. falciparum* fue mayor que la de *P. vivax* (13,36,38,39), lo que puede provocar un aumento en los casos de malaria complicada (40).

En departamento del Amazonas, desde el 2013, ha presentado un aumento histórico de casos, con 1353 casos (47 de *P. falciparum* y 1303 de *P. vivax*), con un pico de casos en el 2015, con 3965 casos (417 de *P. falciparum* y 3548 de *P. vivax*), llegando en 2016 a 3297 casos (842 casos de *P. falciparum* y 2405 *P. vivax*), estos datos sugieren al igual que para muchos departamentos de Colombia un aumento considerable de la malaria y en especial por *P. falciparum* (13, 25–29).

Además, según datos del Sistema de Vigilancia de Salud Pública de Colombia, SIVIGILA, los municipios del departamento del Amazonas que más casos ha reportado en el último quinquenio (2014-2018) son: La Pedrera (5091 casos); Tarapacá (2985 casos); Puerto Nariño (2718 casos); y Leticia (2133 casos). Para el año 2015, los municipios de mayor notificación fueron Leticia (1477 casos) y Puerto Nariño (1463), seguidos de Tarapacá (831 casos) y La Pedrera (316 casos).

2.2. LA MALARIA EN EL AMAZONAS

La región amazónica representa el 45% de selva tropical en el mundo (44), y presenta una extensión aproximada de 6,5 millones de km² (48), cubre el 4,9% del área continental mundial y se encuentra en diferentes extensiones de Brasil, Perú, Colombia, Venezuela, Bolivia, Ecuador, Guyana Francesa, Guayana, Surinam y Venezuela (44). La cuenca del río Amazonas, con 13 grandes tributarios, deposita un promedio de 6.700 m³ de agua por año (48), que corresponde al 20% del agua dulce en superficie terrestre mundial (46). Para Colombia representa una extensión de 476.000 km², con el 41,8% del territorio nacional (49).

Esta región, históricamente presenta transmisión endémica de malaria, donde, específicamente, el mosquito *An. darlingi* ha sido asociado con la dinámica de transmisión (9,11,14,28,50,51). Este vector, junto a *An. albicans* en Venezuela y *An. aquasalis* en Trinidad, Guyana y Venezuela han sido consideradas como transmisores primarios, lo anterior gracias a sus características antropofílicas, abundancias relativas altas y a su capacidad de adaptación a ambientes intervenidos (52).

No obstante, se han encontrado otras especies, las cuales ocasionalmente se consideran como transmisoras de malaria, bien sea por su densidad

poblacional, comportamiento antropofílico o por su infección parasitaria natural (28,52), ejemplos de esto son *An. nuneztovari* y *An. triannulathus*, quienes en la actualidad se consideran como vectores secundarios u ocasionales (52).

Adicionalmente, el medio ambiente amazónico contribuye a que todos estos vectores sean eficientes en la transmisión de la enfermedad, ya que la presencia de un mosaico de formaciones vegetales se encuentra estrechamente asociado a los ciclos hidrológicos de los niveles del río y de las temporadas de lluvia; durante la estación lluviosa, amplias áreas a lo largo de los ríos principales y sus afluentes se inundan, conformando ambientes hídricos estacionales (lagunas, remansos, quebradas, pantanos, etc.) (49), formando así una biota propia que favorece los criaderos de mosquitos (52).

Previos estudios llevados a cabo en Brasil han indicado que la diversidad y abundancia de las especies de *Anopheles* es variable entre las áreas muestreadas (53). En las áreas naturales se encontró desde una diversidad desde 5 diferentes especies de anophelinos, hasta una única especie (*An. darlingi*); las tasas de picada varían entre 0,32 mosquitos/hombre/hora hasta 53 mosquito/hombre/hora; mientras que en las zonas intervenidas (construcción de hidroeléctricas, oleoductos, carreteras y ciudades y barrios de crecimiento no controlado) se ha encontrado diversidad de hasta 7 especies, con abundancias entre 1,5 mosquitos/hombre/hora, hasta 462 mosquitos/hombre/hora (53). Para el Amazonas Colombiano, se han llevado a cabo estudios en áreas rurales de los municipios de Leticia, Puerto Nariño y Tarapacá, en general se encontró una tasa de picada de 18,3 mosquitos/hombre/hora; el área de mayor densidad fue el extradomicilio con 0,91 mosquitos/hombre/hora; seguida de peridomicilio con 0,83 mosquitos/hombre/hora; e intradomicilio con 0,18 mosquitos/hombre/hora (9).

Los patrones de hematofagia de las especies de anofelinos pueden ser alterados por efectos antropogénicos, la distancia entre el bosque de las viviendas, la presencia de otros hospederos, afectan la densidad de las especies de anofelinos en relación con otras especies de culícidos presentes (14,15,54); adicionalmente, se ha descrito que la estacionalidad, principalmente el periodo de transición entre la lluvia y la sequía, aumenta la disponibilidad de criaderos por lo que el vector incrementa su tasa de reproducción (14,16,55).

Adicionalmente, se ha observado una asociación al aumento de densidades de *An. darlingi* en zonas intervenidas antropogénicamente, especialmente en zonas de aprovechamiento forestal (14,56), en zonas de aprovechamiento minero (57,58) y en algunas construcciones como carreteras y represas (16), además se ha evidencias que el crecimiento no planeado de las ciudades amazónicas favorece la presencia de malaria (59). Estas condiciones de intervención producen un aumento en la temperatura el ambiente, por lo tanto,

afecta positivamente al aumento de criaderos disponibles así como al ciclo de vida tanto del vector como del parásito (14).

En la región amazónica existe transmisión de tres especies de *Plasmodium* en humanos (*P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*) (16). Un estudio realizado en comunidades ubicadas a lo largo del río Amazonas y Loretoyacu, mostró una alta circulación de las especies *P. vivax* y *P. malariae*, además de alta frecuencia de infecciones mixtas (60,61).

2.3. BIOLOGIA Y ECOLOGÍA DE *Anopheles* spp

En todo el mundo, alrededor de 475 especies de mosquitos *Anopheles* han sido descritas, y 70 son vectores potenciales de malaria (62,63). Pertenecen a la Familia Culicidae, que presenta dos subfamilias (Culicinae y Anophelinae); la subfamilia Anophelinae, presenta tres géneros (*Anopheles*, *Bironella* y *Chagasia*). El género *Anopheles* por ser cosmopolita y presentar gran distribución geográfica es el género de mayor relevancia en términos de salud pública, del cual se han descrito ocho subgéneros y varios grupos no clasificados formalmente, siendo los subgéneros Kerteszia, Lophopodomyia, Stethomyia y Nyssorhynchus restringidos a las regiones Neotrópicas (64).

Aunque existe otras propuestas para elevar a algunos subgéneros a géneros y reubicar algunas especies en otras categorías, de acuerdo a análisis de los estudios morfológicos y de secuenciación de ADN (64), las nomenclaturas científicas mantienen su clasificación, la cual será adoptada en el presente trabajo.

Para Colombia, se han registrado aproximadamente 47 especies de anofelinos, 9 de las cuales se consideran vectores de la enfermedad (10,65). Para malaria los vectores se han clasificado de acuerdo a su importancia en la transmisión de la infección; siendo considerados vectores primarios los que poseen características biológicas y ecológicas que resaltan su importancia en la transmisión; de acuerdo a Donnelly (66), para que una especie de *Anopheles* sea un vector primario debe presentar características ecológicas y fisiológicas específicas, dentro ellas se encuentra una amplia distribución geográfica, una alta frecuencia en las estaciones, una alta abundancia local, dispersión significativa, capacidad de colonización, adaptación a diferentes ambientes intervenidos por el hombre (construcciones, áreas cultivadas y vehículos), actividad hematófaga, (principalmente en humanos) y susceptibilidad a las infecciones por especies de *Plasmodium* que afectan al hombre (10).

Históricamente se han reconocido como vectores primarios a *An. albimanus*, *An. darlingi* y *An. nuneztovari* para todo el territorio colombiano, siendo *An.*

darlingi el vector primario para la región amazónica (14,67). En Colombia 7 especies actúan como vectores secundarios o son sospechosos de estar asociado con transmisión o tienen una importancia local o regional: *An. pseudopuntipennis*, *An. puntimacula*, *An. calderoni*, *An. neomaculipalpus*, *An. lepidotus*, *An. neivai*, *An. tangeli* y *An. oswaldoi* (10).

En la región de la amazonia (Brasil, Perú, Colombia) se han encontrado 33 especies de Anopheles, la mayoría de los sitios de reproducción de estos mosquitos se encuentran en áreas abiertas, arroyos con agua corriente, en las áreas sombreadas con aguas estancadas, en la vegetación acuática y en arroyos abiertos soleados con fondos arenosos (16,53,68). La transmisión de malaria en la amazonia está dada principalmente por *An. darlingi*, que presenta un comportamiento de picadura mayor hacia horas crepusculares, de 6 pm a 7 am con un pequeño pico en el amanecer de 5 a 6 am, no obstante la actividad de picadura se mantiene durante toda la noche (69).

Un previo estudio llevado a cabo en algunas comunidades indígenas en los municipios de Leticia, Puerto Nariño y Tarapacá, en el Amazonas Colombiano, encontró que *An. darlingi* presenta un comportamiento tanto endofágico como exofágico, mientras que otras especies de Anophelinos, incluyendo *An. oswaldoi* mostró un comportamiento preferencialmente exofágico (9).

Los mosquitos anofelinos tienen un ciclo biológico que comprende una metamorfosis completa (holometábolos), huevos, larvas, pupas y adultos (70). La metamorfosis puede durar de 7 a 20 días, dependiendo de las condiciones de temperaturas y alimento, a temperaturas de 30°C el ciclo puede durar entre 3 a 7 días, pero a temperaturas menores el ciclo se va haciendo más largo hasta llegar a 20 días en temperaturas no menores a 16°C (70,71).

Las hembras requieren un solo apareamiento para depositar todos los huevos (ovipostura) a lo largo de su vida, cada hembra puede ovopositar de 50 a 150 huevos en cada ovipostura, la cual se realiza sobre la superficie de los cuerpos de agua de huecos, canales, ríos, lagunas, entre otros, pero cada especie prefiere un tipo partículas de habitar para realizar su ovipostura (70,71).

Las larvas emergen de los huevos y flotan paralelo a la superficie agua, ya que carecen de sifón para respirar, se alimentan, filtrando el agua del ambiente en el que se encuentran, de algas, bacterias y materia orgánica (70,72). Su ciclo de vida comprende 4 estadios larvales, el cual puede durar de 8 a 10 días en temperaturas normales del trópico para que emerja la pupa; el estado de pupa es el estado para terminar el desarrollo del mosquito adulto, y demora de 2 a 3 días (70–72).

Los adultos, la forma alada, permanece un tiempo en reposo, después de emerger de la pupa, para endurecer su exoesqueleto; una de las

características es su postura en el reposo, ya que el cuerpo y la proboscide se encuentran en Angulo casi recta con respecto a la superficie; aunque ambos se alimentan de néctar, solamente las hembras requieren alimentarse de sangre como suplemento nutricional para poder realizar la ovipostura; algunos mosquitos se alimentan durante toda la noche, otros en las horas crepusculares; otros prefieren sangre de animales, mientras que otros son antropológicos; a aquellos que se alimentan dentro de la vivienda de los humanos, se les llama endofágicos, y los que se alimentan fuera de la vivienda, se les denomina exofágicos; después de alimentarse los mosquitos se mantienen en reposo, la caracterización adecuada de los sitios de obtención de alimento y reposo son importantes a fin de establecer las estrategias de control y prevención de los vectores de malaria (70,72).

2.4. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE *Plasmodium* spp

El patógeno responsable de la malaria es un protozoario intracelular del *phylum* Apicomplexa y el género *Plasmodium* (73). Hasta el momento se han incriminado cinco especies del género *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale* y *P. falciparum*), como los causantes de malaria en humanos; su transmisión ocurre entre personas mediante la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* (34,73–75).

De las cinco especies de *Plasmodium* que infectan al humano, *P. vivax* es el de mayor distribución y el que se localiza a menudo en regiones templadas del mundo; *P. falciparum* produce las formas más graves de paludismo y se encuentra ampliamente distribuido en África y los países del trópico; *P. ovale* se localiza casi de manera exclusiva en África tropical; *P. malariae* está presente en África, Sudamérica y un área de Nueva Guinea (73), por último, *P. Knowlesi*, el cual recientemente fue encontrado de una fuente de transmisión enzoótica en el Sudeste Asiático (75).

Los parásitos del género *Plasmodium* son transmitidos al hombre por mosquitos hembras del género *Anopheles*, que estando infectados, al picar, inoculan los esporozoitos (forma infectante del parásito) (73). *Plasmodium* tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre dos huéspedes (un vertebrado y un mosquito), en los que tienen lugar etapas de desarrollo bien diferenciadas (52,73).

En el huésped vertebrado (humano) se llevan a cabo el ciclo asexual; que inicia cuando el mosquito hembra a través de la picada pasa los esporozoitos (el estadio infectante para el hombre) al torrente sanguíneo del hospedero, allí migran al hígado a través de las células endoteliales (52,73,76). Una vez ahí los parásitos se introducen en los hepatocitos produciéndose el estadio de esquizontes hepáticos, donde los parásitos se reproducen asexualmente

mediante el proceso esquizogonia, dividiendo el parásito por fisión múltiple generando millares de nuevos microorganismo, de cuyo estadio se forman los merozoitos; cuando éstos maduran, destruyen la célula huésped y se liberan al torrente sanguíneo para invadir células sanguíneas (52,73,76).

No obstante, en el ciclo hepático de *P. vivax* y *P. ovale*, se observa que algunos parásitos detienen su desarrollo en el hígado en forma de hipnozoitos, esta es una forma del parásito que permanece latente y que puede activarse por factores aún no determinados (73). Cuando estos hipnozoitos se reactivan, continúan su desarrollo y producen nuevos merozoitos, lo que provoca la recaída de los pacientes en los que aparentemente se había eliminado la enfermedad; los merozoitos son capaces en ese momento de infectar los glóbulos rojos y se inicia el ciclo eritrocítico de la infección (52,73,76).

Una vez en el torrente sanguíneo, el merozoito invade al glóbulo rojo a través de una compleja interacción entre proteínas, formando la vacuola parasitófora, donde sigue el desarrollo del parásito, de merozoito se diferencia en una forma joven conocida como anillo; a continuación se forma un trofozoito que da origen al esquizonte eritrocítico (célula multi-nucleada resultante de la esquizogonia), que al madurar libera de 8 a 32 merozoitos en la circulación sanguínea, estos merozoitos pueden invadir a otros eritrocitos sanos e iniciar nuevamente la esquizogonia. contribuyendo a la persistencia crónica de la infección (52,73,76).

Después de la invasión del eritrocito, algunos parásitos pueden diferenciarse a las formas sexuales del parásito por gametogénesis, en gametocitos masculino y femenino denominados micro o macrogametocitos, respectivamente. Estas son las formas sexuales del parásito e infectantes para la hembra del mosquito (*Anopheles*), tras la picadura de éste a un individuo infectado con *Plasmodium*. Después de estos eventos, los gametocitos continúan su diferenciación en el interior del intestino del mosquito hasta convertirse en gametos, micro o macrogametos, según sea el caso (73).

Posteriormente, en el mosquito, ocurre la fecundación entre los gametos, lo que originará un cigoto (oocigito) que se transformará en ookinete, forma móvil capaz de atravesar la pared intestinal del mosquito para que en la parte externa del intestino se diferencie en ooquiste, seguida de gran cantidad de divisiones celulares que diferenciarán en miles de esporozoitos, los cuales migran hacia la glándula salival del mosquito, donde sufren modificaciones que los preparan para infectar al siguiente huésped humano (52,73,76).

Se conoce que el tiempo de incubación, lapso que media entre la picadura del mosquito infectante y la aparición de signos y síntomas, varía entre especies siendo de 7 a 14 días para *P. falciparum*; de 8 a 14 días para *P. vivax* y *P. ovale*, y de 7 a 30 días para *P. malariae*, no obstante, algunas cepas de *P.*

vivax, en las regiones templadas, puede presentar un periodo de incubación más prolongado entre de 8 a 10 meses (5).

2.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *Anopheles* SPP

En 1818, Johann Wihelm Meigen describe el género *Anopheles*; su descripción causó gran impacto ya que esta especie fue reconocida por actuar como vector de microfilaria y malaria, lo que conlleva a una masiva colecta y clasificación de sus especies (69). Esta clasificación tiene como objetivo agrupar y categorizar las entidades a través de sus rasgos biológicos, estas han sido definidas por Ernst Mayr & W. J. Bock (69) como “el agrupamiento de entidades similares en una serie jerárquica de clases anidadas, inclusive las clases de nivel superior se subdividen comprensivamente dentro de clases menos inclusivas a siguientes clases de menor nivel” (69). Estos grupos son conocidos como rango taxonómico o categórico (69).

Los grupos taxonómicos deberían representar los rangos filogenéticos y las relaciones naturales entre las especies; No obstante, esta no se cumple estrictamente para *Anopheles*, debido a una clasificación masiva y subjetiva que se realizó desde su descubrimiento (basados en su distribución y las formas de las escamas en tórax y abdomen); por lo que en la actualidad se está trabajando en una clasificación basada en subcategorías (en el orden de: secciones, series, grupos, subgrupos y complejos) (69), como una iniciativa de agrupar las especies de una forma natural (77).

Los problemas en la taxonomía de *Anopheles* se debe a las grandes similitudes morfológicas entre especies, y a que en algunas especies se debe recurrir a correlacionar con características de las formas inmaduras (larvas y pupas), situación que las técnicas modernas de identificación (PCR) ayudan a resolver (77).

En Colombia existen 5 subgéneros de los cuales *Anopheles* (llamado también como *Nyssorhynchus*) contiene los vectores primarios de los parásitos de malaria, estos incluyen a *An. darlingi*, *An. albimanus* y *An. nuneztovari*. Además, existen cuatro complejos en el subgenero *Nyssorhynchus* (*An. albitarsis*, *An. Benarrochi*, *An. nuneztovari* y *An. triannulatus*) (78), en el cual no se encuentra *An. darlingi* y *An. mattogrossensis*, especies de distribución neotropical.

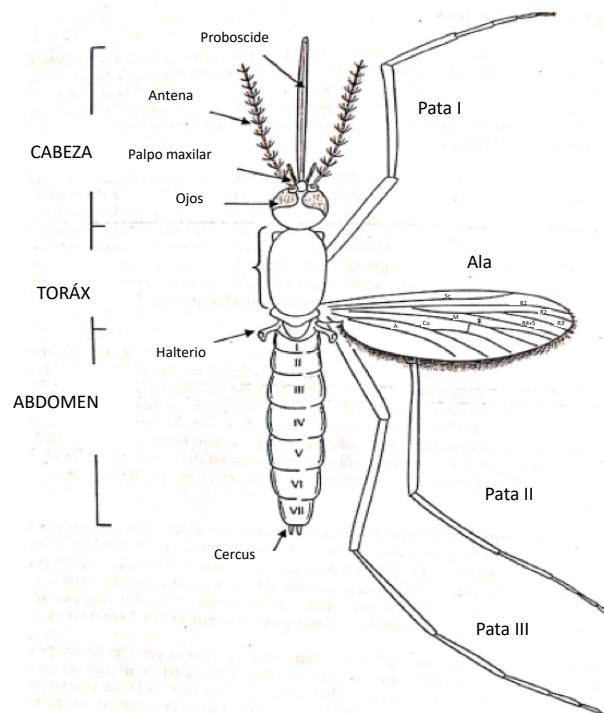
Conocer las especies presentes en un área determinada presenta una importancia académica y de salud pública dentro del ejercicio práctico (77). La importancia radica en la generación de información sobre cambios en horas y lugares de picada, frecuencias y densidades de especies y poblacionales, además de establecer controles efectivos contra el vector (77,78).

2.5.1. Taxonomía convencional

Las claves taxonómicas basadas en la morfología son la metodología más empleada para la identificación de los mosquitos, esta se basa en las distinción de caracteres específicos ubicados en cabeza, tórax, abdomen, patas y patrones de coloración en las venas de las alas (65,78).

Los mosquitos *Anopheles* pertenecen a la clase Insecta, orden Diptera (al tener solo un par de alas), que en estado adulto se caracterizan por tener el cuerpo dividido en tres segmentos o tagmas (cabeza, torác y abdomen). En la cabeza se encuentran un par de antenas y un par de ojos; en el torác se encuentran tres pares de patas y dos pares de alas, este además esta dividido en tres segmentos: protorác, donde se ubican las patas frontales y protorácicas, el mesotorác, donde se ubican las patas medias o mesotoracicas y un par de alas, y el matatorác, en el que si ubican las patas posteriores o metatoracicas y los halterios o balancines (alas modificadas como estructura para mejorar el vuelo) (**Figura 1**).

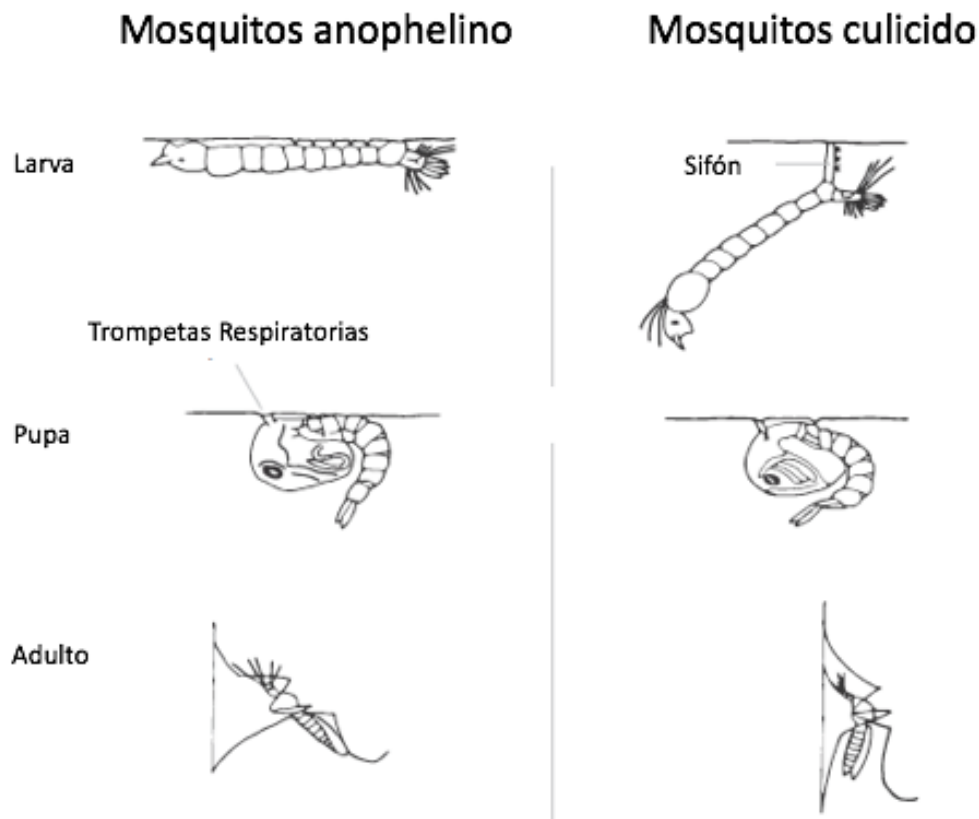
Figura 1. Esquema dorsal de un Culicinae



Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

La **Figura 2** muestra diferencias generales entre las especies de las categorías de la subfamilia Culicinae y la familia Anophelinae, la cual a nivel de huevos, los anophelinos poseen unas estructuras que las hace flotar en la superficie de los cueros de agua; a nivel larval los anofelinos carecen de sifón (tubo respiratorio) por lo tanto deben tomar el aire manteniendo el cuerpo paralelo a la superficie del agua; a nivel de pupa, no existen diferencias para su identificación en campo; y a nivel de adulto los anophelinos se diferencian de los culicidos por la postura sobre la superficies, ya que estos mosquitos posicionan el cuerpo y la proboscide a un ángulo casi recto con respecto a la superficie donde se posa (65,71).

Figura 2. Diferencias morfológicas de las Subfamilias de Anophelinae y Culicinae.



Por otra parte, en el desarrollo del presente proyecto se tuvo en cuenta la clasificación de Gonzales y Carrejo (2009) (65), los cuales realizan una descripción morfológica de los principales caracteres que se deben considerar

en la identificación del género *Anopheles* de Colombia, a continuación se resumen los caracteres tenidos en cuenta:

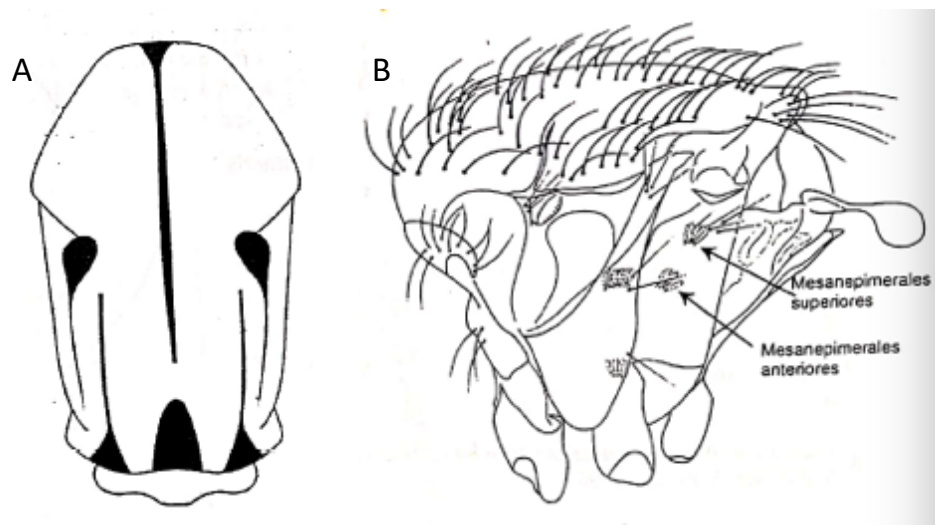
Cabeza

Antenas con 13 flagelómeros alargados con pelos dispersos y menos abundantes que en los machos; palpos maxilares casi tan largos como la proboscis, de cinco segmentos, el primero corto y los otros alargados.

Torác

El scutum de algunos grupos de especies pueden presentar patrones de coloración, independientes de la coloración de las escamas (**Figura 3A**). La mayoría de las especies del subgénero *Nyssorhynchus*, presentan patrones como se muestra en la **Figura 3A**; y en el pleuro torácico es la presencia o ausencia de grupos de escamas claras mesanepimerales, **Figura 3B**.

Figura 3. A. Vista dorsal del tórax de *Anopheles*. B. Vista lateral de Tórax de *Anopheles*



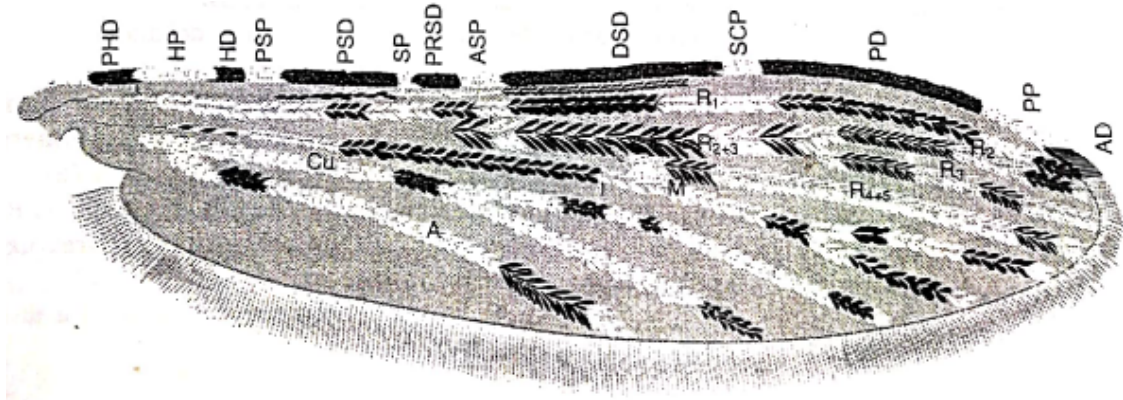
Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

Alas

Los autores tuvieron en cuenta la nomenclatura de las venas de las alas propuesta por Harbach & Knight (1980) y las de Wilkerson y Peyton (1990) quienes les dan nombres a las manchas de la vena costal y que se pueden identificar de acuerdo con puntos claros y oscuros tomando como referencia los de la especie *An. (Cellia) kochi* y *An. (Anopheles)* de la serie Arribalzagia así (65): Sucostal clara (SCP), sector claro (SP), sector claro accesorio (ASP), sector oscuro (SD), humeral clara (HP), humeral oscura (HD), presector claro

(PSP), presector oscuro (PSD), preapical oscura (PD), preapical clara (PP), apical oscura (AD) y apical clara (AP) (**Figura 4**) (65).

Figura 4. Explicación de la nomenclatura de Ala de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*)

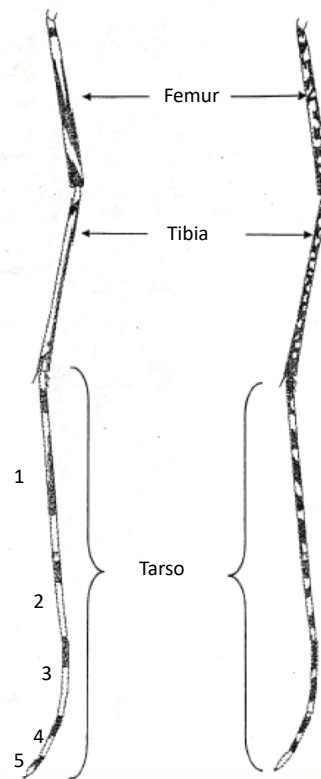


Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

Patas

Las escamas que recubren las patas posteriores presentan gran variación, en el subgénero *Nyssorhynchus* estas variaciones son de utilidad taxonómica, ya que puede ser utilizadas como características diferenciadores a nivel de especie, **Figura 5** (65).

Figura 5. Pata posterior de *Anopheles*



Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

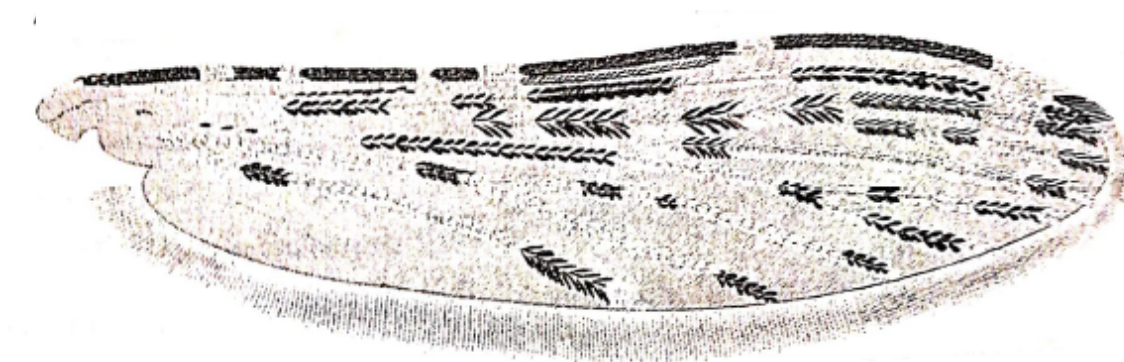
De esta manera, Gonzales y Carrejo (2009) realizan una descripción de las características que diferencian a *An. darlingi* de los otras especies de anofelinos, la cual se encuentra dentro de la sección *Argyritarsis*, caracterizada por presentar el tarsomero posterior 5 completamente claro, así: palpomero 4 marrón, apicalmente con parche moderadamente grande de escamas claras, nunca con escamas claras esparcidas; palpomero 5 claro, sin banda basal de escamas oscuras; mesanepiteron generalmente con grupo de escamas claras anteriores, sin grupo de escamas claras superiores; tarsomero posterior 2 con áreas oscura basal de 0.35-55 la longitud del tarsómero (**Figura 6**) ; áreas oscuras prehumeral (PHD) 1.5 mayor que 7.0 (generalmente 2.0-5.0) la longitud de la clara humeral (HP) (**Figura 7**); tergum II-VII con tufos de escamas oscuras cudolaterales; y sternum I sin líneas submedial de escamas claras, completamente desnudo (65).

Figura 6. Representación gráfica de las patas posteriores de *An. darlingi*.



Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

Figura 7. Esquema de ala de *An. darlingi*



Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

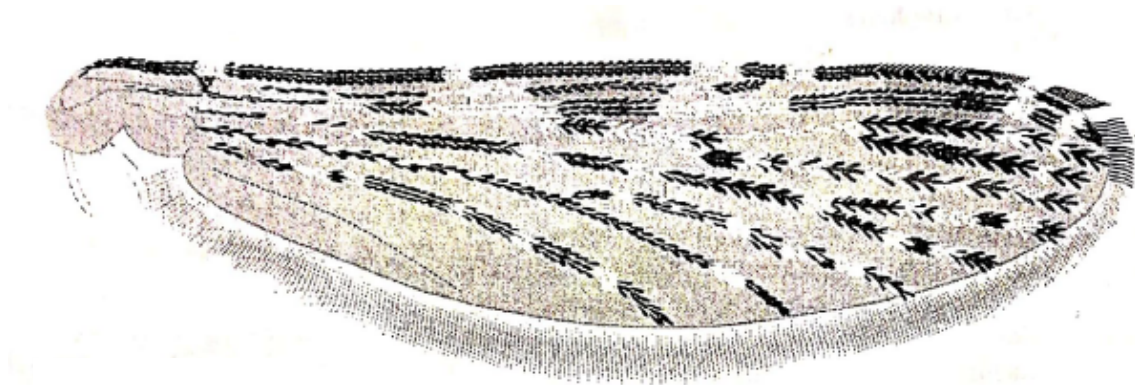
Así mismo los autores realizan la descripción para *An. mattogrossensis*: tarsómeros posteriores (Ta-III 1-5) oscuros, con articulaciones claras (**Figura 8**); áreas claras costales; vena anal con cuatro o mas áreas oscuras (**Figura 9**); último tergum abdominal y cerci sin escamas, con setae; stemitos I-VII con tufos de escamas claras mesales (65).

Figura 8. Representación gráfica de las patas posteriores de *An. mattogrossensis*.



Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

Figura 9. Esquema de ala de *An. mattogrossensis*



Fuente: Gonzales y Carrejo, 2009 (65)

2.5.2. Métodos Moleculares

2.5.2.1. DNA Barcoding

Tanto la detección de parásitos, como la adecuada identificación de los vectores, son claves para el entendimiento de características de la epidemiología y la ecología de la malaria (77,78). Para una óptima identificación del vector es necesario realizar una adecuada captura y almacenamiento de los especímenes recolectados, esta constituye una de las principales limitantes al emplear las claves taxonómicas basadas en la morfología (79); es por esto que basados en herramientas moleculares se ha trabajado en la implementación de técnicas que disminuyan estas limitaciones, en este contexto, la identificación empleando ADN barcoding resulta ser un método adecuado para la identificación, puesto que esta se obtiene a partir de la extracción de ADN de cualquier parte del individuo (80–82).

El ADN barcoding es un sistema diseñado para proporcionar identificación de las especies de manera precisa y en poco tiempo (83); emplea un fragmento de aproximadamente 710 pares de bases (pb) del gen *Mitocondrial Citocromo C Oxidasa I* (mtCOI), para clasificar a nivel de especie una amplia cantidad de taxones (84). Presenta la ventaja de ser un cebador universal robusto, permitiendo la recuperación de la cola 5' de casi todos el Phylum Animal; además posee mas rango de señales filogenéticas que cualquier otro gen mitocondrial; permite discriminación de especies estrechamente relacionadas o de grupo filogeograficos con una sola especie; y provee comparaciones filogeneticas más profundas (85).

Hebert *et al* 2003, evaluó el potencial del gen COI como herramienta para la identificación taxonómica. Se crearon perfiles del gen de siete de los más

diversos miembros del Phylum Animal; ocho de los más diversos ordenes de Hexapoda; y 200 miembros para las familias más representativas del orden Lepidoptera. En cada categoría se usó especies nuevas para asignar la identificación de acuerdo con los resultados de la evaluación del COI y así se demostró que a nivel de especie de Lepidoptera hubo un éxito de indentifiación del 100%, demostrando que las diferencias de las secuencias del gen son suficientes para asignar la categoría taxonómica de organismos superiores (86).

Para algunos países del trópico en Latinoamérica se han llevado estudios dirigidos a caracterizar las especies de vectores circulantes, empleando las técnicas previamente mencionadas, por ejemplo en Brasil, McKeon *et al.* (2010) realizó la amplificación del gen COI y la secuencia del gen ribosomal ITS2 para comparar diferentes poblaciones de *An. marajoara* y observar la divergencia en ciudades del estado de Amapá; encontraron dos linajes de poblaciones de *An. marajoara*, uno de ellos presentes en todas las áreas muestreadas y la otra restringida al oeste del estado, los resultados muestran que existió divergencia de las poblaciones la cual se mantuvo con la barrera geográfica del río Jarí; no obstante con el análisis gen ribosomal de ITS2 no se encontraron diferencias en la divergencia entre los especímenes muestreados, demostrando una vez más la utilidad de COI para la comparación de especies, no obstante una de sus limitantes la constituye la comparación a nivel intra-específico, donde la variación es baja, limitando la adecuada identificación de subpoblaciones (87).

Así mismo este ha sido usado en análisis filogenético de grupos y complejos de grupos, Scarpassa *et al* (2016) mediante la amplificación del gen mtCOI identificaron tres linajes de *An. nuneztovari* en el Amazonas brasileño (88).

Para Colombia se han desarrollado estudios con ADN barcoding para la identificación de las especies y para la diferenciación de estas en grupos complejos, González *et al*, (2017), realizaron en el departamento de Córdoba un muestreo de mosquitos anofelinos durante tres noches seguidas usando trampas de luz CDC, ubicadas en el intradomicilio y en el peridomicilio, con cambio de trampas CDC cada 24 horas; los anofelinos hembras las identificaron mediante las claves taxonómicas disponibles; y para los especímenes que presentaron pérdida de partes, dificultando su identificación, se llevó a cabo identificación mediante ADN barcode amplificando el gen COI (89).

Un total de 778 *Anopheles* fueron colectados de los cuales 406 se capturaron en el peridomicilio y 355 en el intradomicilio. Los resultados mostraron la presencia de seis especies de *Anopheles* [(*An. albimanus* (83%), *An. triannulatus* (12%), *An. pseudopunctipennis* (4%), *An. nuneztovari* (1,3%), *An. neomaculipalpus* (0,26%) y *An. argyrtarsis* (0,13%)]; el análisis de ADN barcode

ayudó a identificar 9 individuos que no pudieron ser identificados con las claves morfológicas; finalmente, los resultados de este estudio mostraron un 10% de error en la identificación taxonómica con base en claves morfológicas (89). Adicionalmente, los resultados mostraron que del total de hogares muestreados en 38 de estos los mosquitos recolectados presentaron infecciones parasitarias siendo el 57,8% por *P. vivax*, el 34,2% para *P. falciparum* y el 7,8% mixtas; finalmente, los autores reportaron cuatro especies de mosquitos con infecciones parasitarias: *An. nuneztovari*, *An. pseudopunctipennis*, *An. Albimanus* y *An. triannulatus* (89).

Estudios realizados en el Amazonas Colombiano muestra que los trabajos en identificación de mosquitos con el gen *COI* son escasos, Gómez *et al*, (2015), realizaron un muestreo entre 2005-2012, amplificando el gen *mtCOI* para confirmación molecular de la identificación morfológica obtuvieron un 83,2% de coincidencia entre las dos clasificaciones (90).

Además, Orjuela *et al*, (2013), en el Departamento de Putumayo, Colombia, colectaron mosquitos con aspiradores bucales en el intradomicilio y peridomicilio, entre las 6:00pm y las 9:00pm; confirmaron la identificación morfológica mediante la secuenciación del gen *mtCOI*, los resultados mostraron 11 especies de anofelinos circulantes, *An. albitarsis* (1,8%), *An. benarrochi* B (72,3%), *An. braziliensis* (0,05%), *An. costai* (0,1%), *An. darlingi* (19,3%), *An. mattogrossensis* (0,1%), *An. neomaculipalpus* (0,1%), *An. oswaldoi* s.l. (0,1%), *An. puntimaculata* (0,1%), *An. rangeli* (5,12%) y *An. triannulatus* (0,1%) (29).

Así mismo, Ruiz *et al* (2010), compararon la identificación morfológica de especies similares de *An. nuneztovari* y *An. dunhami* capturadas en el departamento de Amazonas, Antioquia y Norte de Santander; con la llevada a cabo con los genes *ITS2* y *mtCOI* encontrando una concordancia en la identificación del 96,9% con *ITS2* y del 97,5% con el gen *mtCOI* (91).

2.6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *Plasmodium* spp EN MOSQUITOS

Uno de los indicadores más importantes en el análisis vectorial, es la medición de la cantidad de mosquitos infectados en una población determinada (92,93). Esta, se realiza a través de la determinación de la tasa de esporozoitos, que consiste en calcular el número de mosquitos con presencia de esporozoitos en sus glándulas salivales (94). Este cálculo, junto con la tasa de picadura, es utilizado para realizar estrategias de focalización de acciones para control de la malaria (95).

2.6.1. Técnicas microscópicas

Esta técnica es desarrollada para observar ooquistes en el intestino medio y esporozoitos en las glándulas salivares de los mosquitos; se realiza removiendo las glándulas salivares frescas, de mosquitos recién capturados, y observados directamente al microscopio (94,96). Aunque presenta dos desventajas importantes ya que se deben realizar en el menor tiempo después de la captura del mosquito, teniendo en cuenta que algunos autores describen un rango de días después de la infección adecuado para la realización de esta práctica (96); La segunda limitante consiste en no poder tipificar la especie de *Plasmodium* infectante (94,97).

2.6.1.1. ELISA

El Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA, de las siglas del inglés: Enzyrna-Linked Inmunosorbent) utiliza anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen epitopes repetidos de la proteína del circunsporozoito (CSP), la lectura de la prueba se realiza por una reacción colorimétrica que puede ser cuantificada por densitometría (94,98,99).

Esta prueba, ha sido desarrollado para detectar y distinguir las proteínas circunsporozoito (CSP) de *P. falciparum* y las dos variantes de *P. vivax* (VK210 y VK247) en mosquitos infectados (96). La sensibilidad y especificidad se ve reducida por los procesos de estandarización realizados para esta prueba que varía de acuerdo a la región donde se lleva a cabo y a condiciones propias del fabricante (98–100). Además, se ha encontrado que presenta falsos positivos debido a la reacción cruzada de la identificación de especies de *Plasmodium* que afectan a animales (58), también se encontró que el método en ocasiones reacciona a un único *Plasmodium* impidiendo la detección de infecciones mixtas (101), lo que tiene implicaciones en el análisis de la dinámica de transmisión, por lo tanto en la incriminación como vectores probables (93).

En Brasil, en el estado de Pará, se encontró a *An. darlingi* con una tasa de infección de 1,6% y a *An. aquasalis* con 1,1% por *P. falciparum* y *P. vivax* (102). En el estado de Amapá, región amazónica de Brasil se capturaron mosquitos por medio de cebo humano protegido y con trampas de luz CDC; para medir la tasa de infección se llevó a cabo la prueba de proteína de Circunsporozoito del *Plasmodium* por medio del método de ELISA; se encontró una tasa de infección total de 0,8% encontrando infecciones de *P. vivax* VK210 y VK247, *P. falciparum* y *P. malariae*, en seis especies de mosquitos (*An. albitarsis* con 15 positivos, *An. nuneztovari* con 4 y *An. braziliensis*, *An. triannulatus*, *An. oswaldoi*, con uno positivo cada uno; además de nueve mosquitos positivos para *P. malariae* (*An. albitarsis* (n= 5), *An.*

braziliensis (n= 1), *An. nuneztovari* (n= 1), *An. triannulatus* (n= 1) y *An. ranguei* (n= 1); el autor resalta que algunos *P. malariae* encontrados en mosquitos pueden ser *P. brasilianum*, un parásito de primate no humano ya que no existen diferencias mediante esta técnica entre ambas especies (102).

En las Guayanas Francesas, en una población indígena, se calculó la tasa de infección; encontrando a *An. darlingi* con las tres especies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*) circulantes con tasas de infección global de 0,1%, 0,1% y 0,05% en las tres localidades muestreadas (55).

En el mismo país se desarrolló un estudio en área de extracción de oro, donde se realizó la prueba de ELISA y qPCR (de las siglas del inglés: (quantitative polymerase chain reaction); por medio de la metodología de ELISA no se encontró mosquitos infectados, pero por medio de qPCR se encontró a *An. darlingi* infectado con *P. falciparum* con una tasa de infección de 1,1% y a *An. marajoara* infectado con *P. vivax* con una tasa de infección de 6,4%. El autor aclara que debido a las dificultades presentes por la pruebas ELISA para determinar la infección, como la falta de cadena de frío de las muestras que deterioran las proteínas de los parásitos y la reacción cruzada de la prueba con *Plasmodium* no humanos lo que puede resultar en falsos positivos, se apoyó en las pruebas qPCR, para calcular la infección de los pools (58).

Naranjo *et al.* (103) encontró cuatro individuos infectados (*An. nuneztovari* (n= 1), *An. triannulatus* (n= 2) y *An. darlingi* (n= 1)), con *P. vivax* VK247 y VK2010 en cuatro localidades de Antioquia y Córdoba, Colombia. Los autores realizaron una segunda ELISA para la confirmación de la infección y únicamente una PCR anidada para la confirmación de las pruebas de ELISA positivas, demostrando que las pruebas de PCR son mas sensibles que las de ELISA.

En el departamento de Putumayo se encontró dos especies infectadas naturalmente de *P. vivax* (*An. oswaldoi* (0,2%) y *An. rangeli* (8,4%)), usaron el método de ELISA para su detección (VK210 y K247); sin embargo, repitieron la prueba en todos individuos que resultaron positivos (36 individuos) para disminuir la posibilidad de tener falsos positivos (27). Mediante el mismo método, se encontró 5 individuos de *An. benarrochi*, para un porcentaje de infección parasitaria de 0,1% (29).

En el mismo departamento, Putumayo, por medio de pruebas de ELISA, a partir muestras individuales cabeza y tórax para todas las especies encontradas, excepto para *An. darlingi* que se tomaron pools de no más de 5 individuos; encontraron únicamente *An. benarrochi* infectada con *P. vivax*, esta especie resulta estar involucrada en la transmisión de malaria, por su alta antropofilia y por ser la única especie encontrada infectada naturalmente con *P. vivax*, sin embargo no se conoce su biología y ecología lo que dificulta la toma de decisiones para el control vectorial; la confirmación con *mtCOI* resulta

util sobre todo para estudios de incriminación de vectores ya que es necesaria la correcta identificación de las especies (29).

Por medio de pruebas de ELISA y PCR y qPCR se ha calculado la tasa de infección de las poblaciones de mosquitos presentes en diferentes areas de la región amazónica, se ha encontrado diferentes especies infectadas naturalmente con *Plasmodium* entre ellas a *An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. albitarsis*, *An. triannulatus* y *An. mattogrossensis* (**Tabla 2**).

2.6.1.2. Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de *Plasmodium* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR de las siglas del inglés: Polymerase Chain Reaction) brinda mayor sensibilidad que la tecnica de ELISA, detectando los parasitos en bajas parasitemias (104,105). Snounou (105) desarrolló un protocolo para la identificación de las especies de *Plasmodium* mediante la técnica de PCR anidada. Una primera amplificación empleó primers específicos para la subunidad ribosomal 18s (ssRNA), posteriormente el producto de esta primera PCR se utiliza como blanco de amplificación para la identificación de tres especies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. malariae* y *P. falciparum*), usando los primers específicos para cada especie.

Da Rocha *et al*, desarrolló un estudio en el estado de Pará, amazonas brasileiro, donde se colectaron mosquitos de 6 a 12 pm mediante cebo humano protegido y por medio de trampas de luz CDC, se extrajo material genético en pools de 3 a 5 individuos para calcular la tasa de infección por medio de las técnicas de ELISA, usando CPS específico para *P. falciparum*, *P. vivax* VS210, *P. vivax* VX247 y *P. malariae* y por PCR anidada.; encontraron, por medio de la técnica de ELISA, una tasa de infección general de 6,2%, de estos se encontró para *An. darlingi* una infección de 22,4%, para *An. albitarsis* fue 5,2% y *An. rondoni* fue 3,6%, adicionalmente la frecuencia de *Plasmodium*, detectada por ELISA, fue de 54,3% para *P. vivax*, 37,1% para *P. falciparum* y 8,6% para *P. malariae*; por otra parte, el análisis por PCR anidada mostró ser superior con una positividad de 68%, lo anterior sugiere que la prueba de PCR fue mas sensible, mostrando especies positivas para *Plasmodium*, que las pruebas de ELISA no logró detectar (106).

En el departamento de Córdoba se realizó muestreo de anophelinos en viviendas de diferentes localidades, se extrajo el ADN de pools de no más de 10 mosquitos *Anopheles* de la misma especie usando la metodología de PCR anidada propuesta por Snounou; el resultado evidenció que 38 viviendas resultaron con pools de mosquitos de *Anopheles* positivos, 13 viviendas positivas con *P. falciparum* (34,2%); 23 con *P. vivax* (57,8%); y tres con infecciones mixtas (7,8%) (89), el autor demuestra que la cantidad de mosquitos en cada pool depende de la abundancia por especie encontrada.

Recientemente, Rondón *et al*, (2019) realizan extracción de ADN de sangre y material fecal de primates no humanos, de tres departamentos de Colombia (Santander, Antioquia y Boyacá), para detectar la presencia de *Plasmodium spp.* mediante PCR anidada (105); se encontró la presencia de cinco especies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. simium*, *P. malariae* y *P. brasillanum*); las frecuencias más altas se encontraron en la especie *Alouatta seniculus* con 20% de infección de *P.vivax/P. simium* y 40% de *P. malariae/P. brasillanum*, ambas en muestras obtenidas a partir de sangre (107), concluyendo que la metodología es muy sensible para otras especies de *Plasmodium* no humanos.

Finalmente, otro estudio llevado a cabo en los departamentos de Amazonas, colectaron *An. triannulatus* a los cuales se les realizó la detección de la infección por medio de pruebas de ELISA y confirmación por medio de PCR anidada, para el departamento del Amazonas, se encontró una tasa de infección de 1,2% para la localidad de Puerto Nariño y 0,8% para Tarapacá (108), mostrando que existen otras especies que pueden ser incriminadas en la transmisión y que por el empleo de técnicas convencionales como ELISA no se tienen datos de la circulación parasitaria con gran sensibilidad, disminuyendo la posibilidad de incriminar otras especies de vectores limitando el establecimiento de estrategias adecuadas de control.

Tabla 2. Descripción de la detección de *Plasmodium* en mosquito

LUGAR DE ESTUDIO	ESPECIE DE VECTOR	TÉCNICA EMPLEADA	INFECCIÓN PARASITARIA	REFERENCIA
Departamento de Putumayo	<i>An. oswaldoi</i> <i>An. rangeli</i>	ELISA VK210	0,2% 8,4%	Quiñones <i>et al</i> , 2006 (27)
Departamento del Cauca	<i>An. nuneztovari</i>	ELISA VK247 PCR anidada	0,1%	Naranjo-Diaz, <i>et al</i> , 2013 (103)
	<i>An. triannulatus</i>		1,5%	
	<i>An. darlingi</i>		0,08%	
	<i>An. nuneztovari</i>		0,05%	
Departamento de Putumayo	<i>An. bennarrochi</i> <i>B</i>	ELISA VK210 VK247	1,1%	Orjuela <i>et al</i> , 2013 (29)
Guyana Francesa	<i>An. darlingi</i>	ELISA	0,1% 0,1% 0,05%	Girod <i>et al</i> , 2008 (55)
	<i>An. darlingi</i>	ELISA	1,1%	

Guyana Francesa	<i>An. marajoara</i>	RT-PCR	6,4%	De Santi <i>et al</i> , (2016) (58)
Meta	<i>An. darlingi</i>	ELISA VK210 VK247	0,05%	Ahumada <i>et al</i> , (2013) (109)
Córdoba	<i>An. nuneztovari</i>	ELISA VK247	0,3%	Gutiérrez <i>et al</i> , (2011) (110)
	<i>An. darlingi</i>		1,5%	
Puerto Carreño, Vichada	<i>An. darlingi</i>	ELISA VK210	0,08%	Jiménez, <i>et al</i> (2012) (111)
Nariño	<i>An. calderoni</i>	P. vivax VK210 P. falciparum	0,1%	Orjuela, <i>et al</i> (2015) (112)
Córdoba	<i>An. nueneztovari</i>	P. falciparum P. vivax VK210 PCR	0,1%	Álvarez <i>et al</i> , (2012) (97)
Loreto, Perú	<i>An. darlingi</i>	P. falciparum P. vivax VK210, VK247	1,%	Parker <i>et al</i> , 2013 (113)
Loreto, Ucayali, Madre de Dios y San Martín, Perú	<i>An. darlingi</i>	P. falciparum P. vivax VK210, VK247	0,98%	Florez-Medozza <i>et al</i> , (2004) (114)
	<i>An. benarrochi</i>		0,1%	
Loreto, Perú	<i>An. nuneztovari</i>	RT-PCR gen rRNA 18S	1,8%	Prussing <i>et al</i> , (2018) (115)

3. HIPÓTESIS

3.1. HIPOTESIS CONCEPTUAL

La diversidad y abundancia de los mosquitos *Anopheles* varia a nivel del intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio.

La prevalencia de infección por especies de *Plasmodium* varia entre las poblaciones de anophelinos y localidades muestreadas.

3.2. HIPÓTESIS OPERACIONAL ALTERNA

La diversidad y abundancia de los mosquitos *Anopheles* varia a nivel del intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio.

La prevalencia de infección por especies de *Plasmodium* varia entre las poblaciones de anohelinos y localidades muestreadas.

3.3. HIPÓTESIS OPERACIONAL NULA

La diversidad y abundancia de los mosquitos *Anopheles* no varia a nivel del intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio.

La prevalencia de infección por especies de *Plasmodium* no varia entre las poblaciones de anohelinos y localidades muestreadas.

4. OBJETIVO

4.1. GENERAL

Determinar la abundancia y diversidad de las especies de *Anopheles* y la frecuencia de infección de tres especies de *Plasmodium*, en los vectores colectados en dos comunidades del Amazonas Colombiano.

4.2. ESPECÍFICOS

1. Describir las especies circulantes de *Anopheles* spp. mediante clasificación taxonómica y confirmación molecular.
2. Determinar la abundancia de las especies de *Anopheles* en las comunidades de Tipisca y Doce de Octubre en el Amazonas Colombiano.
3. Establecer la tasa de picadura de las especies de *Anopheles* de acuerdo al ecotopo evaluado (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio).
4. Establecer la tasa de picadura de las especies de *Anopheles* de acuerdo a la hora muestreada (entre 6 pm y 11 pm)
5. Determinar la prevalencia de infección por *Plasmodium* spp y la distribución de *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae* en las especies de *Anopheles* spp identificadas.

5. METODOLOGÍA

5.1. ENFOQUE METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio corresponde a una investigación con enfoque empírico analítico de tipo cuantitativo, y se desarrolló en el marco del proyecto “Estrategias de prevención y control de malaria en el Amazonas, en respuesta al reciente brote de la enfermedad”, proyecto financiado con recursos del Sistema General de Regalías y el Fondo Colombiano de Ciencia, Tecnología e Innovación, bajo el convenio de cooperación especial entre la Gobernación de Amazonas y la Fundación Instituto de inmunología de Colombia (proyecto BPIN-266 y acuerdo especial de cooperación– FIDIC N° 0020) (**ANEXO 1**).

5.2. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional analítico de tipo transversal basado en información primaria obtenida de la captura de las poblaciones de *Anopheles* spp. circulantes en las comunidades de Tipisca y Doce de Octubre en el Amazonas Colombiano, analizando la abundancia de las poblaciones en diferentes ecotopes y horas de muestreo, así como la frecuencias de tres especie de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*).

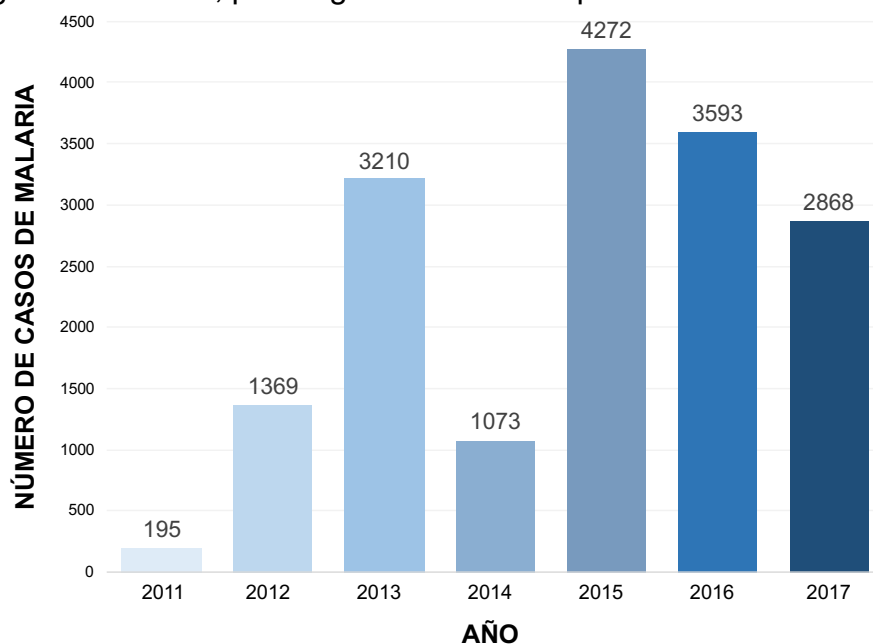
5.3. POBLACIÓN

La población de estudio fue definida como los mosquitos del género *Anopheles* y de característica antropofílica ubicados en los tres ecotopes (intradomicilio: interior de la vivienda; peridomicilio: ubicado en el espacio entre la vivienda y a no más de 20 metros; y extradomicilio: ubicado a mas de 20 metros y el límite de bosque) definidos para su muestreo.

5.4. DISEÑO MUESTRAL

La población de estudio fue colectada en las comunidades de importancia epidemiológica que de acuerdo con los datos registrados en SIVIGILA, en el departamento del Amazonas, durante el año 2013 se presentó un aumento significativo de casos, nunca antes registrado, y dos años más tarde (2015) se registró el año con más casos de malaria de la década. Los casos disminuyen paulatinamente durante los siguientes años (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

); sin embargo, estos picos de infección desencadenaron una serie de acciones de los entes departamentales y convenios con instituciones de investigación en salud, para lograr la atención oportuna del brote de malaria.



Gráfica 1. Número de casos de Malaria en el Departamento de Amazonas 2011 – 2017. Tomado de SIVIGILA. 2011-2017

Según el SIVIGILA, en el año de 2015 el municipio de Puerto Nariño registró el 34,2 % (n=1421) de los casos de malaria en el Departamento de Amazonas. Se encontró circulación de *P. vivax* (n=1298; 91,3%) y *P. falciparum* (n=109; 7,7%) e infecciones mixtas (n=14; 1,0%) en la población. De las 20 comunidades indígenas y el casco urbano del municipio, las comunidades de Tipisca y Doce de Octubre registraron el 50,9% (n=723) de los casos, siendo las comunidades de mayor riesgo de malaria.

Las viviendas en cada lugar de muestreo fueron seleccionadas por conveniencia de acuerdo con las indicaciones de los promotores de salud de cada comunidad, el cual manifestada características como abundancia de mosquitos, cercanía con factores de riesgo, casos de malaria y seguridad para los participantes del estudio.

Las capturas fueron realizadas de 6 pm a 12 pm. Cada hora consistía en un muestreo de 50 min y 10 de descanso que eran aprovechados para cambio de sitio de muestreo y rotulado de material de captura. Luego cada mosquito capturado se almacenaba y rotulaba con información de colecta (Hora, Ecotopo, Lugar, fecha, nombre de colector).

5.5. DESCRIPCION DE LAS VARIABLES

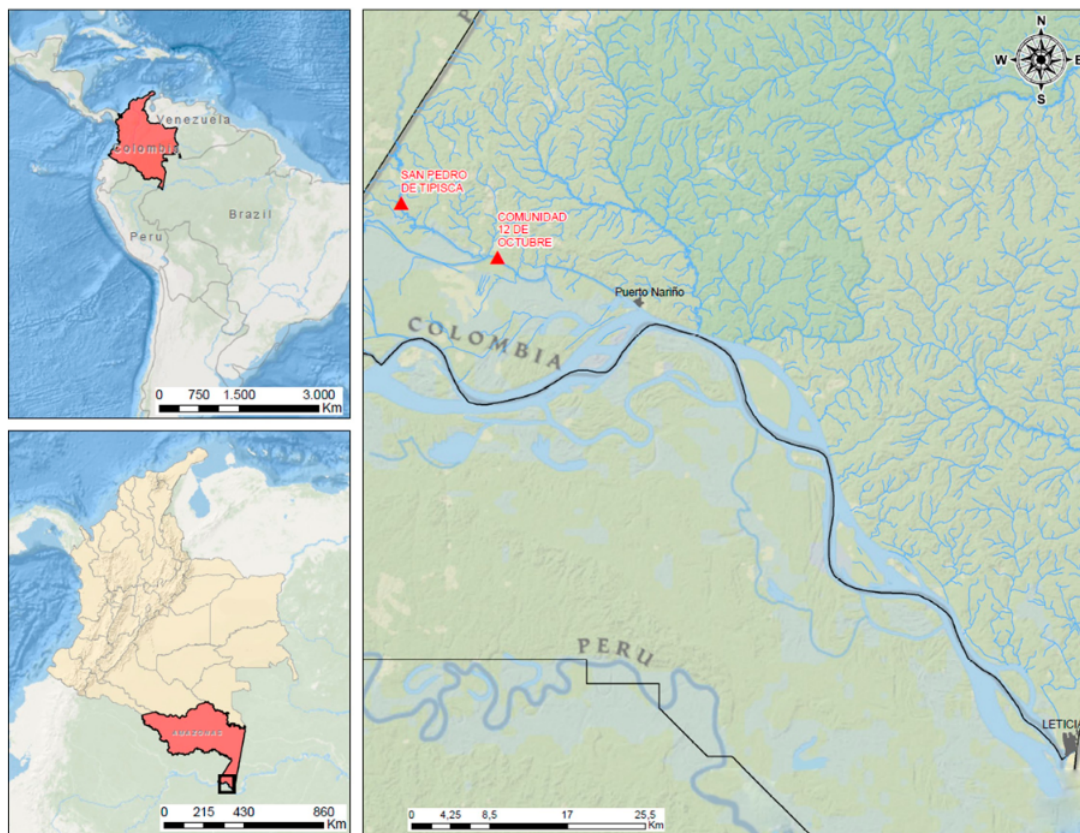
Se definió como variables dependientes a las especies de mosquitos *Anopheles* capturados y a los resultados de infección de *An. darlingi* por *Plasmodium spp.*

Se definió como variables independientes a los lugares de Muestreo (Tipisca 1, Tipisca 2 y Doce de Octubre) y a los ecotopos (intradomicilio, peridomicilio y estradomicilio).

5.6. TECNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACION

Este estudio se llevó a cabo el mes de Junio del 2016 en dos comunidades indígenas del departamento del Amazonas - Colombia, estas comunidades fueron tenidas en cuenta para la toma y captura de los individuos por los criterios de cercanía a afluentes del río Amazonas, accesibilidad para el muestreo, seguridad para el personal de captura de vectores y por corresponder a zonas de relevancia epidemiológica en términos de enfermedades transmitidas por vectores.

Las comunidades muestreadas fueron Doce de Octubre (DO) y Tipisca (Tp) (**Gráfica 2**), para esta última localidad se llevaron a cabo dos muestreos con intervalos de tiempo de tres semanas y serán llamados de ahora en adelante Tp1y Tp2, estos dos muestreos se llevaron a cabo debido a que la comunidad Tipisca fue la de mayor relevancia epidemiológica, además de ser de más fácil acceso y por previos trabajos llevados a cabo con su comunidad; dentro de cada zona fue seleccionada una (1) vivienda a muestrear, la selección de ésta fue preferencial de acuerdo con las recomendaciones de los promotores de salud, quienes por su conocimiento de la dinámica local indicaron la zona de mayor abundancia de mosquitos (**Gráfica 3**).



Gráfica 2. Mapa de ubicación de las comunidades de muestreo.

5.6.1. Captura, almacenamiento y transporte

En cada comunidad se realizó un muestreo durante tres días consecutivos, en cada vivienda se realizó la colecta de especímenes diaria entre las 6:00 pm a 11:00 pm, realizando simultáneamente la toma en los tres ecotopes de la vivienda, intradomicilio (dentro de la vivienda), peridomicilio (entre 0 a 10 metros de la vivienda) y extradomicilio (mayor de 20 m de distancia), con un tiempo de muestreo de 50 min y 10 de descanso. Los mosquitos se capturaron con el método de cebo humano protegido (116,117).

Cada colector contaba con un consentimiento informado, revisado y aprobado por el Comité de Ética (**ANEXO 5**). Los colectores cambiaron de sitio cada hora, para evitar el posible sesgo debido a diferencias en atracción y habilidad del personal para las capturas.

Todos los especímenes fueron almacenados en seco, individualmente y en tubos de ensayo con silica gel. Para cada individuo se tomó el dato de hora de colecta, área y sitio de captura. Por último, las muestras se transportaron al

laboratorio de Biología Molecular la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) para su identificación taxonómica y análisis molecular (**Gráfica 3**)..

5.6.2. Identificación taxonómica y molecular de las especies de mosquitos

Para la identificación taxonómica por morfología de los individuos, se empleó la clave dicotómica de González y Carrejo (65) y la de Wilkerson *et al*, (118). Las claves para mosquitos hembras tienen en cuenta los patrones de manchas en las alas y en los miembros posteriores para su identificación a especie (65,119).

Para el análisis molecular se tomó una muestra representativa de los individuos colectados, teniendo en cuenta la localidad de captura, el ecotopo muestreado y la identificación a nivel taxonómico. El ADN barcoding, se llevó a cabo amplificando una región de 710 pb con primers específicos (LCO1490 y HCO2198) dirigidos hacia un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidase subunit I (*COI*) (84,86). Este gen es aceptado como estándar, debido a su robustez, exactitud y poder de resolución (120). El tamaño de la muestra fue calculado basado en la abundancia de especies, se asumió una proporción de 0,5, una precisión de 0,05 y un coeficiente de intervalo del 95%; se obtuvo un tamaño mínimo de 163 individuos. Este cálculo fue obtenido del comando *sampsi* en el software STATA® (versión 12). Adicionalmente, una sub muestra proporcional al número original de mosquitos colectados de cada localidad fue seleccionado para la secuenciación de un segmento del gen *COI*. Para la confirmación molecular de las especies menos abundantes, todos los individuos fueron secuenciados.

Para la obtención del DNA de los mosquitos fueron usadas las patas, la extracción se llevó a cabo con el kit comercial Genomic DNA Mini Kit® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante; las muestras fueron eluidas en un volumen final de 50 µl en buffer que contenía 10 mM Tris-HCl y 0.1 mM EDTA a pH 9,0, almacenado a -20°C para su uso.

Posteriormente, el kit ReadyMix PCR fue usado para los ensayos de PCR en un 50 µl de mezcla de volumen conteniendo KAPA HIFI HOTStart (Kapa biosystems) y 0,2 µM de cada primer. Las condiciones del ciclo térmico consistió en una denaturación inicial a 94°C por 1 minuto, 40 ciclos de amplificación de 94°C por 40 segundos, 52°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto, seguido por un paso final de elongación de 72°C por 5 minutos.

Los productos de amplificación fueron observados en geles de agarose al 1,5% (Invitrogen) teñidos con SYBR safe y visualizados en un MiniBIS Pro

image (DNR Bio-imaging Systems). La purificación se llevó a cabo utilizando el kit *Wizard® genomic DNA purification*, siguiendo las recomendaciones del proveedor, estos productos fueron enviados a secuenciar en un secuenciador ABI-3730 XL (Macrogen, Seoul, South Korea).

5.6.3. Análisis evolutivos del Gen COI

Para el análisis del gen *COI* la secuencias fueron editadas y ensambladas utilizando el programa CLC Genomics Workbench Version 3.6.5 (CLC Bio, Cambridge, Ma, USA).

Las secuencias fueron comparadas y analizadas con las secuencias de referencia disponible en la base de datos de GenBank con los códigos de acceso descritos a continuación: KP193458.1, JF923693.1, JF923694.1, JF923695.1, MF381713.1, MF381596.1, MF381733.1, MF381650.1, MF381626.1, MF381726.1, MF381725.1, MF381671.1, MF381589.1, MF381728.1, MF381675.1, MF381608.1, HM022406.1, KU892052.1, KU892055.1, KU892053.1, KU892051.1, KU892054.1, KU892056.1, KU892057.1, KU892058.1, KU892059.1, KU892060.1, KC555065.1, GQ918272.1, GQ918273.1, DQ076235.1, DQ076236.1.

Inicialmente, las secuencias fueron obtenidas en formato fasta y fueron sometidas a una comparación inicial, a través de alineamiento múltiple, usando el algoritmo MUSCLE (121). Por otra parte las secuencias del gen *COI* obtenidas del desarrollo del presente proyecto fueron ingresadas en la base de datos de GenBank (número de acceso MH924354-MH924552), para que sean de acceso público.

El software DnaSP (v5) (122), fue empleado para calcular la cantidad de sitios segregantes (S), el número de *singletons* (Ss), sitios de parsimonia (P), número de Haplotipos (H) y la diversidad de nucleotídica (π), para la construcción y análisis de la red de haplotipos se empleó el programa NETWORK v5.1, con el algoritmo Median-joining network (123), esta aproximación permitió evaluar las mutaciones, distribución y frecuencia y que dan lugar a los haplotipos encontrados en el fragmento del gen *COI*.

5.6.4. Detección molecular de *Plasmodium* e identificación de especie

Para la detección de la infección parasitaria en los individuos colectados, fueron recuperadas la cabeza y tórax del mosquito, posteriormente se les realizó extracción del ADN, según el protocolo previamente descrito, finalmente las muestras fueron agrupadas en pools de no más de 5 individuos, obteniendo un total de 228 muestras para el análisis molecular.

La detección parasitaria se realizó empleando la técnica de PCR anidada, una primera amplificación empleo primers específicos para la subunidad ribosomal 18s (ssRNA), posteriormente el producto de esta primera PCR fue utilizado como blanco de amplificación para la identificación de tres especies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. malariae* y *P. falciparum*), usando los primers específicos para cada especie (105) todas las condiciones de la mezcla y amplificación fueron descritas en un trabajo previamente publicado por nuestro grupo de investigación (60).

Como control negativo fueron empleadas hembras de *Anopheles albimanus* criadas en laboratorio y libres de infección parasitaria y como control positivo se infectaron hembras de la misma especie con gametocitos de la cepa NF54, según el método de infección por membrada artificial de Looker & Taylor-Robinson 2014 (124).

5.7. CONTROL DE ERRORES Y SESGOS

Se controló el sesgo de captura de los técnicos mediante el cambio de ecotopo a cada de hora de muestreo. De esta manera se controló el sesgo por capacidades técnicas en la captura, o por atrayente.

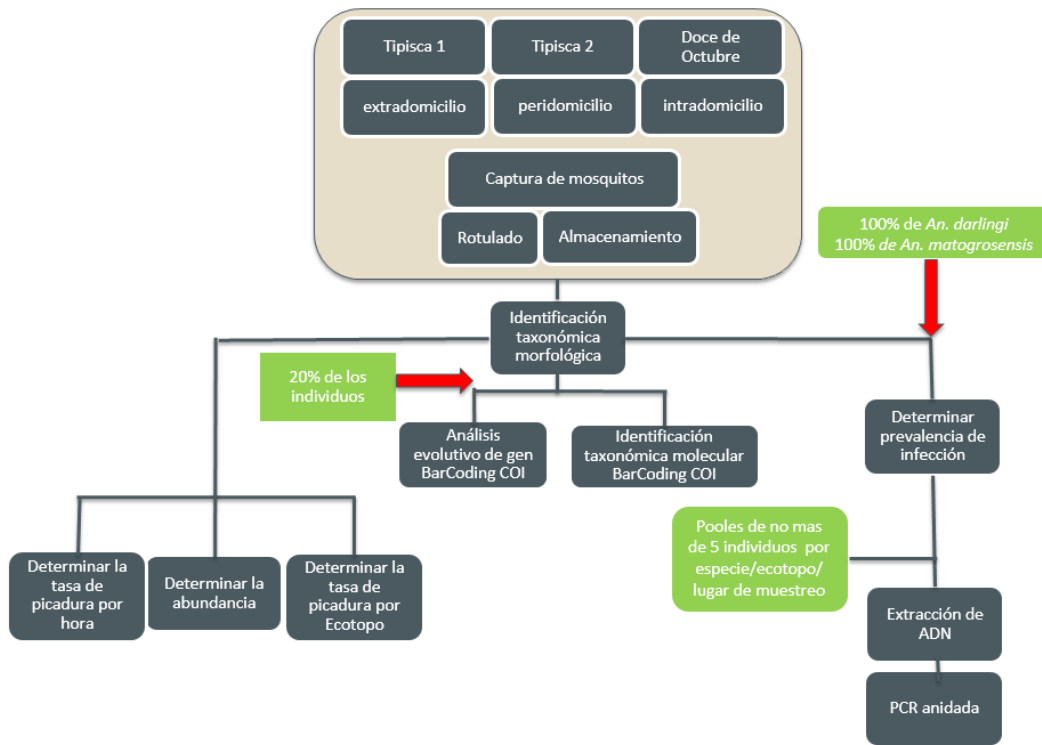
Se delimitó los sitios de muestreo en introdomicilio, peridomicilio y extradomicilio. El intradomicilio fue delimitado dentro de la vivienda. El peridomicilio se estableció un espacio intermedio entre el límite de la vivienda y los 20 metros de distancia (10m) para evitar el sesgo de densidad poblacional por efectos de la residualidad de los insecticidas impregnados en las viviendas

5.7.1. Análisis Estadístico

Las variables cuantitativas (el número de individuos e infección por *Plasmodium*) fueron reportadas, con su respectiva media y desviación estándar (DE) y se probó normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Las variables categóricas (tiempo, sitio y ecotopo) fueron expresadas en frecuencia y porcentaje con un intervalo de confianza del 95% (CI 95%). El test de Fisher o χ^2 fue usado (dependiendo del valor que fue observado) para evaluar la diferencia entre los porcentajes.

La actividad de picadura fue calculada como la media geométrica de los mosquitos encontrados por hora en las seis horas de muestreo en cada localidad. El análisis estadístico fue desarrollado a través de análisis de varianzas (ANOVA) y ajuste post-test de Bonferroni, para evaluar las diferencias en la cantidad de mosquitos colectados por hora, localidad y sitios

(Intradomicilio, peridomicilio o extradomicilio) los valores $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos. Todos los datos fueron analizados usando el software STATA® (versión 14) para analizar los datos, licenciado para la Universidad Nacional de Colombia (UNAL).



Gráfica 3. Flujograma de la metodología aplicada

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se encuentra en el marco de un macoproyecto de investigación titulado “Estrategias de prevención y control de malaria en el Amazonas, en respuesta al reciente brote de la enfermedad” (**ANEXO 1**. Proyecto BPIN-266, acuerdo especial de cooperación Gobernación de Amazonas – FIDIC N° 0020), aprobado y supervisado por la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario (EMCS), Comité de Investigaciones Éticas (CEI) (Colombia: resolución CEI-ABN 026-0001061) (

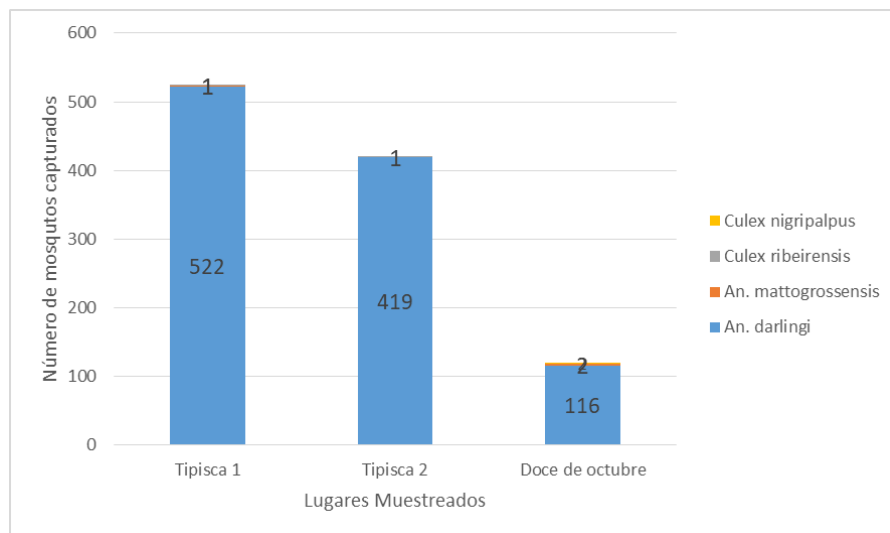
ANEXO 2). Adicionalmente, el Comité Institucional para la Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad de la Universidad CES (Comité de Ética de la Biodiversidad), mediante Acta No. 12 del 15 de noviembre de 2018 considera que el proyecto cumple con los lineamientos solicitados por el comité, relacionados con el cumplimiento de la normatividad en materia de recolección de especímenes de la diversidad biológica (**ANEXO 3**); y el Comité Institucional

de Ética de investigación en Humanos Universidad CES, mediante Acta No. 99 del 29 de enero de 2019, establece que el proyecto se encuentra adscrito al grupo de investigación Biología Molecular e Inmunología (BIOMOL) y que esta ceñido a los principios éticos que regulan la investigación en seres humanos y que el equipo de investigación es idóneo para desarrollar el proyecto de acuerdo con los principios de validez y confiabilidad, por consiguiente, se aprueba el proyecto por el tiempo que dure su ejecución (**ANEXO 4**).

7. RESULTADOS

7.1. Identificación morfológica de las especies de mosquitos y análisis DNA Barcode

Un total de 1.086 especímenes fueron colectados en los tres muestreos realizados; 21 de estas (2,3%) perdieron partes importantes del cuerpo durante la captura (alas y/o patas) y no se pudo determinar taxonómicamente mediante las técnicas basadas en su morfología; 1.065 especímenes fueron determinados taxonómicamente (usando las claves dicotómicas de Gonzáles y Carrejo, y las de Wilkerson *et al.*) (65,118). La determinación taxonómica encontró a *An. darlingi* (n=1,057; 99,2%) como la especie predominante en la población y únicamente otro anophelino, fue colectado en el estudio, *An. mattogrossensis* (n=4; 0,4%). Un solo género de la subfamilia Culicinae fue encontrado en el estudio, correspondiendo a *Culex spp.* (n=4; 0,4%) (**Gráfica 4**).

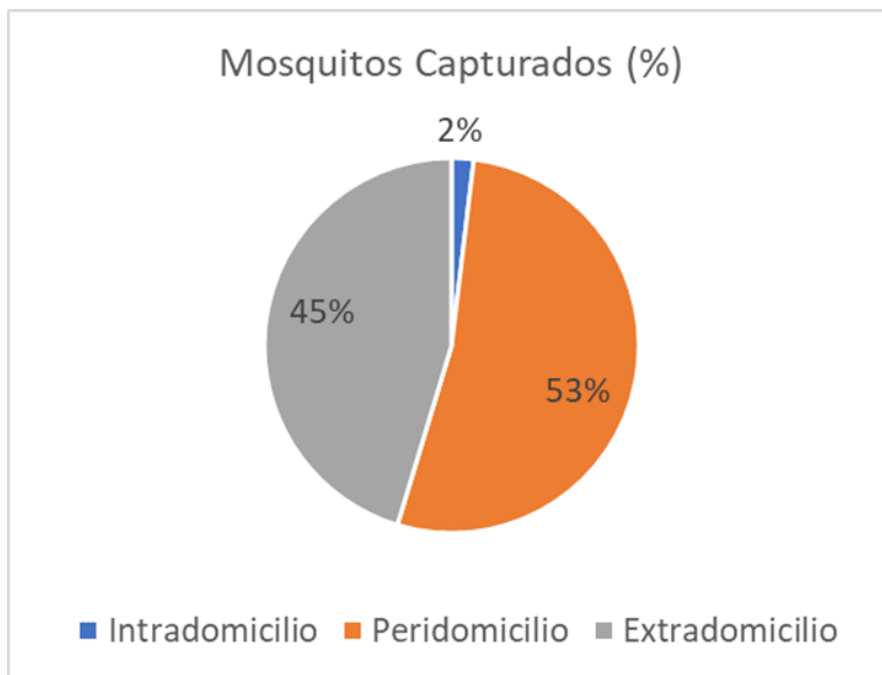


Gráfica 4. Número total de especies capturadas por lugar muestreado.

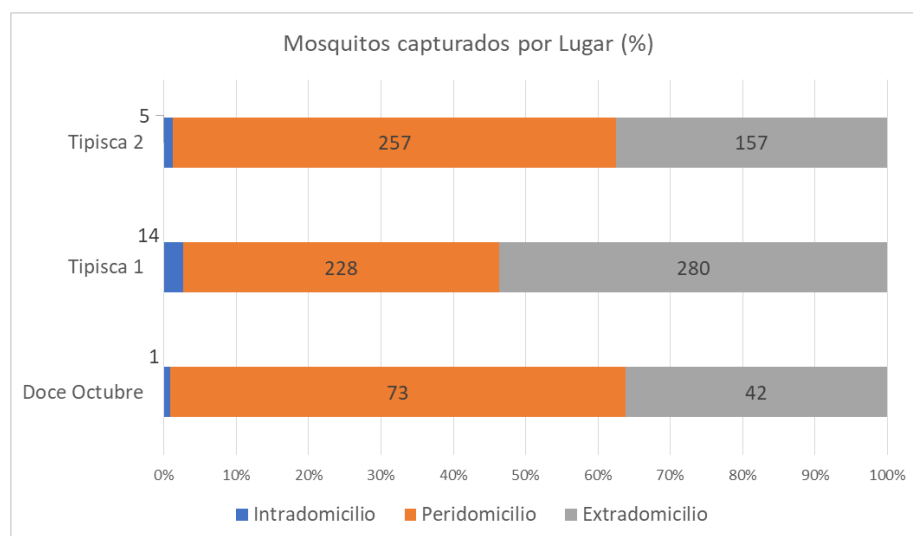
La identificación molecular por DNA barcode se realizó sobre 214 especímenes, seleccionados para la confirmación por secuenciación de un fragmento del gen *COI*. Los resultados del DNA barcode identificó a *Culex nigripalpus* (n=2) y *Culex ribeirensis* (n= 2). Así mismo, de las 210 muestras restantes fue *An. darlingi*; dentro de las cuales se cuentan 14 especímenes que presentaron pérdidas de partes claves para su determinación morfológica, cuatro fueron determinadas taxonómicamente como *An. mattogrossensis* y 185 que concuerdan con los encontrados usando las claves dicotómicas.

7.2. Variación de la abundancia de mosquitos de acuerdo con el área de estudio

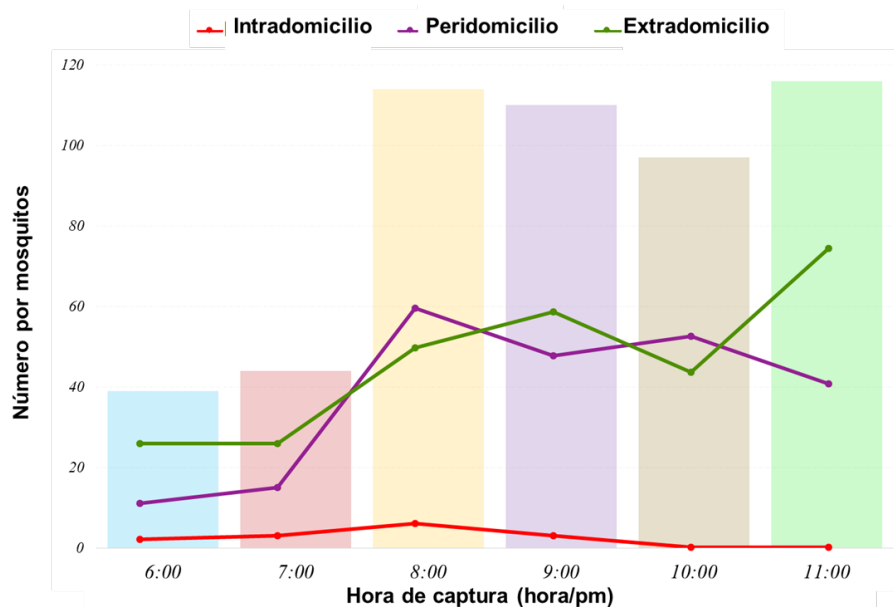
Dos áreas de estudio de dos comunidades indígenas del Amazonas colombiano fueron muestreadas. La primera toma se llevó a cabo en Tipisca (Tp1), donde se capturaron un espécimen de *Culex ribeirensis* (0,4%: 0,004-1,095%CI); uno de *An. mattogrossensis* (0,4%; 0,0004-1,0 95% CI) y 522 *An. darlingi* (99,6%-99,9% 95%CI). En este primer muestreo en Tp1 se encontró que la hora de mayor frecuencia fue a las 11:00 pm (n=116, 22,1%) (**Gráfica 7** *Error! No se encuentra el origen de la referencia.*), y el ecotopo extradomicilio fue el de mayor colecta de mosquitos (n=280; 53,6%) (**Gráfica 5 y Gráfica 6**).



Gráfica 5. Porcentaje de mosquitos por sitio de captura

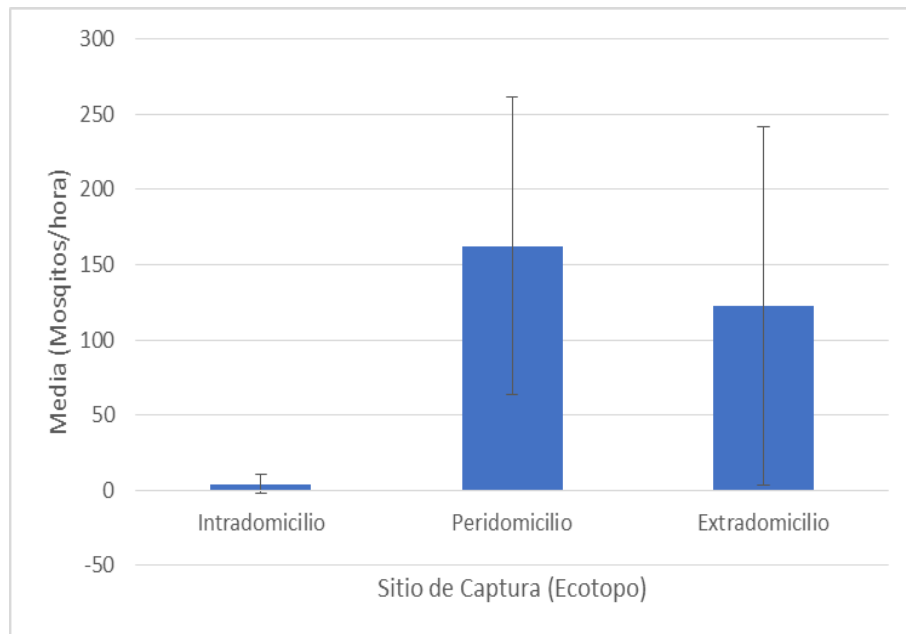


Gráfica 6. Porcentaje de mosquitos de cada ecotopo por cada lugar muestreado

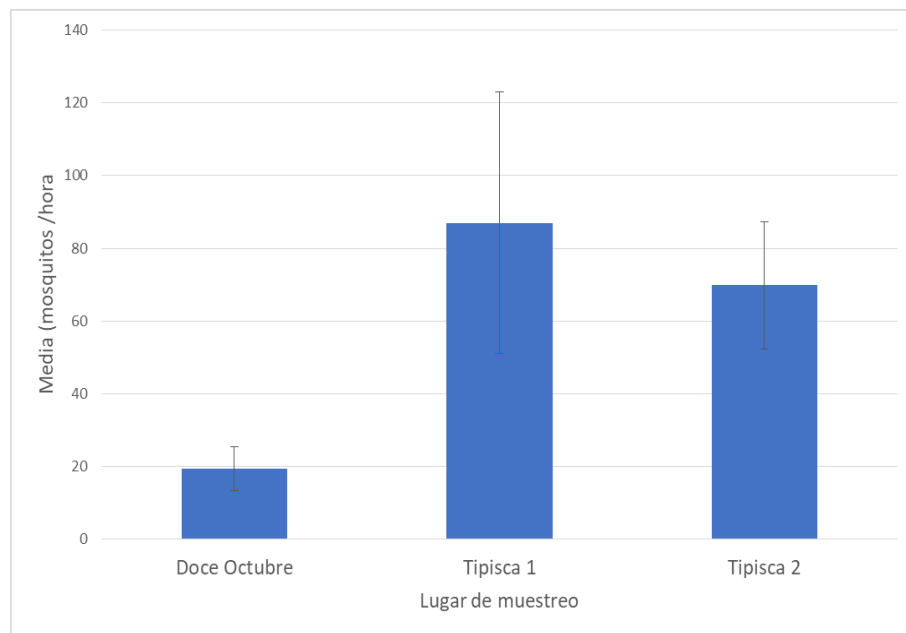


Gráfica 7. Número total de mosquitos capturados en Tipisca 1 (Tp1). Las barras muestran el número total de mosquitos capturados en cada hora de muestreo, mientras que las líneas corresponden a la cantidad de mosquitos capturados en cada ecotopo.

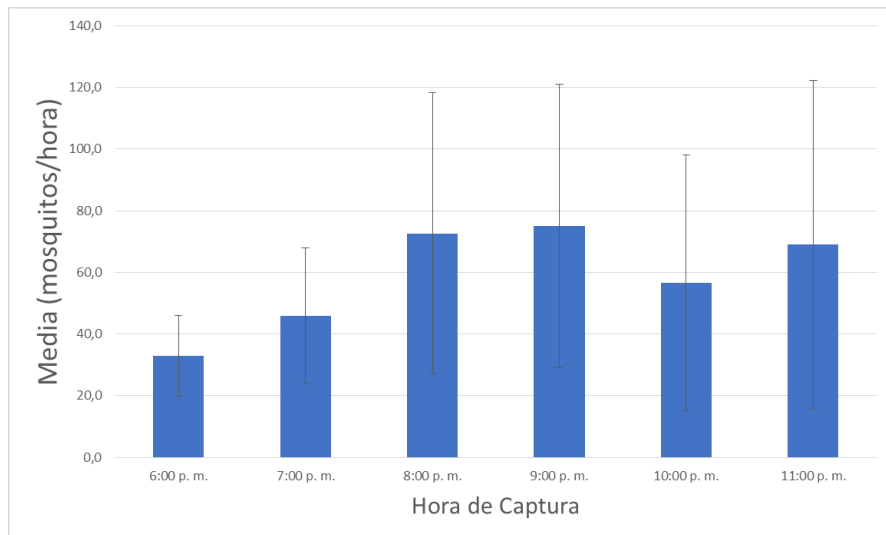
Teniendo en cuenta la alta densidad de mosquitos para esta área una segunda toma de especímenes fue llevada a cabo (repetiendo el muestreo tres semanas después en la casa seleccionada para la primera toma- Tp2); en este muestreo se capturaron un espécimen de *Culex* (0,4%: 0,004-1,095%CI) y 419 especímenes de mosquitos de la especie *An. darlingi* (99,8%:98,6-99,9, 95% CI), la hora de mayor abundancia fue a las 9:00 pm (n=92; 21,9%), y el ecotopo de mayor colecta fue el peridomicilio (n=257; 61,3%) (**Gráfica 11, Gráfica 13 y Gráfica 15**).



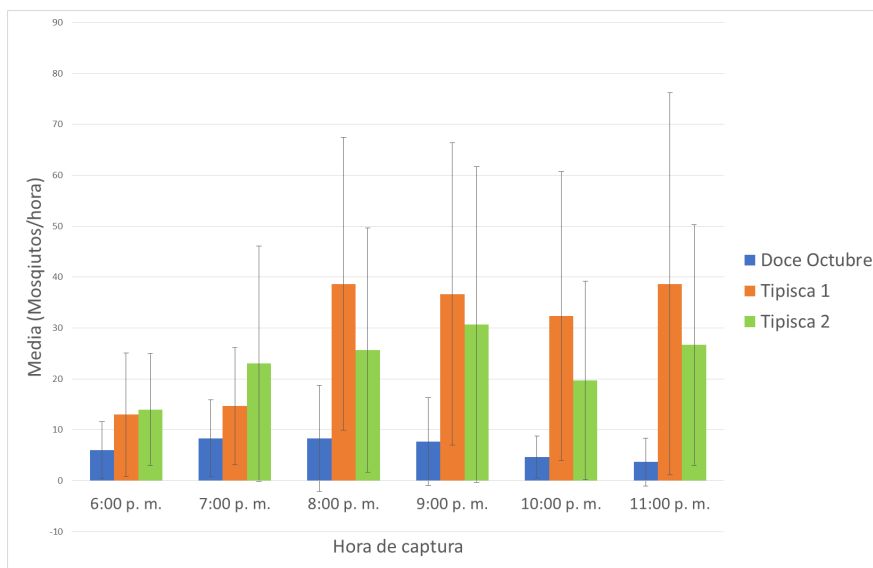
Gráfica 8. Media de mosquitos capturados por hora de cada una de los sitios de captura. Con su respectiva Desviación estándar.



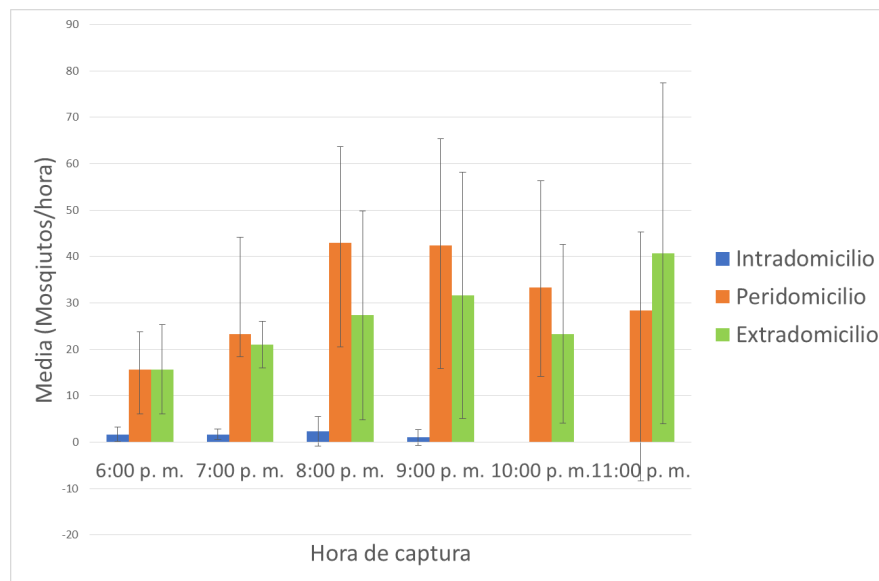
Gráfica 9. Media de mosquitos capturados por hora de cada los lugares muestreados. Con su respectiva desviación estándar.



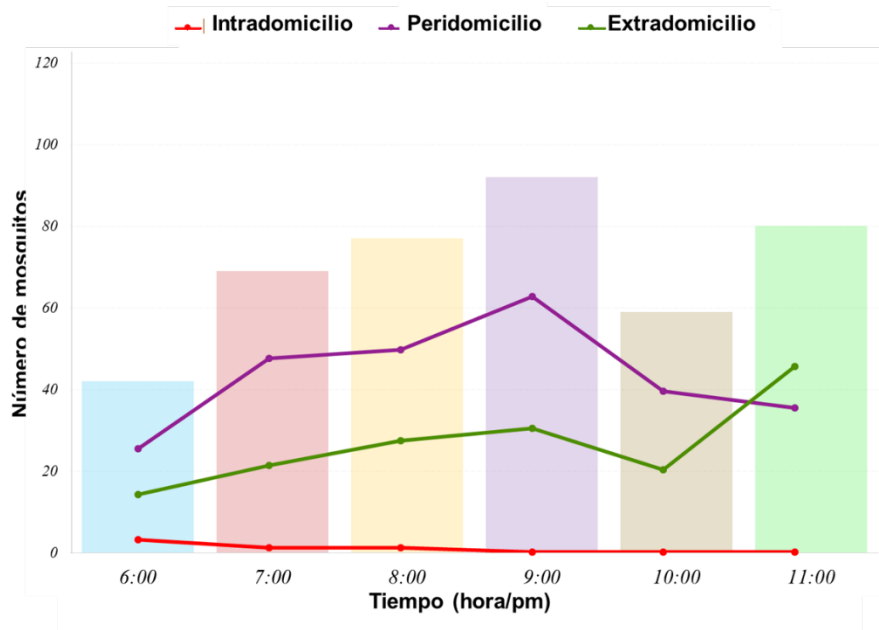
Gráfica 10. Media de mosquitos capturas por hora por cada hora de muestreo. Con su respectiva desviación estándar.



Gráfica 11. Media de mosquitos capturados por hora de cada uno de los lugares muestreados. Con su respectiva desviación estándar.



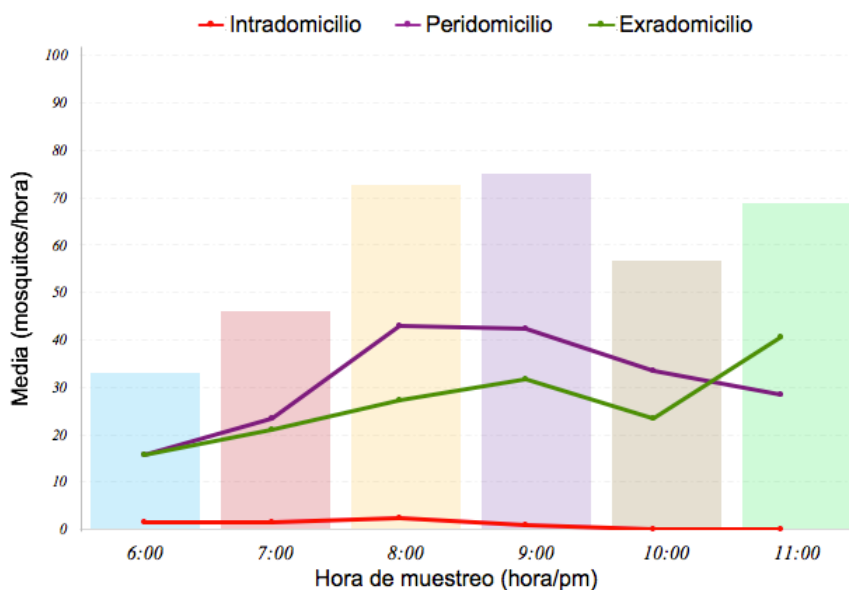
Gráfica 12. Media de mosquitos capturados por hora de cada uno sitios capturados. Con su respectiva desviación estándar.



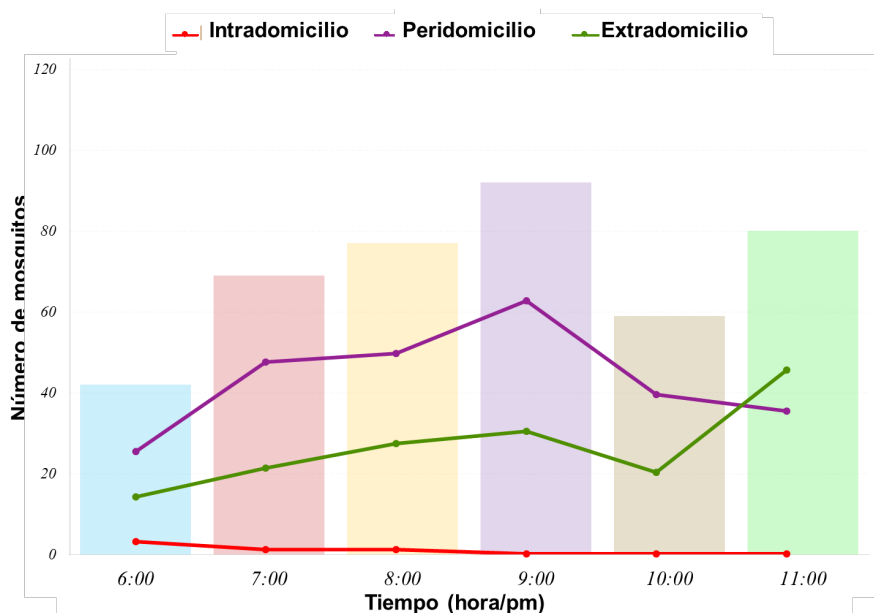
Gráfica 13. Número total de mosquitos capturados en Tipisca 2 (Tp2). Las barras muestran el número total de mosquitos capturados en cada hora de muestreo, mientras que las líneas corresponden a la cantidad de moquitos capturados en cada ecotopo.

En la localidad de Doce de Octubre se colectaron un menor número de mosquitos, se encontró 121 especímenes, dos de las cuales fueron clasificadas como *Culex nigripalpus* (1,6%:0.2-5,8, 95%CI), tres como *An.*

matogrossensis (2,5%: 0,5-7,0 95%CI) y 116 (95,9%: 90,6-98,6, 95%CI) como *An. darlingi*. La mayor abundancia de esta especie fue a las 7:00 pm (n=25; 20,6%) y 8:00 pm (n=25; 20,6%). El ecotopo de peridomicilio fue el de mayor captura (n=73; 62,9%) (**Gráfica 15**).



Gráfica 14. Media número de mosquitos de acuerdo al ecotopo y a la hora de muestreo. Las barras muestran la media total de mosquitos de acuerdo con el la hora de muestreo, mientras que las líneas muestran la media de mosquitos por ecotopo muestreado.



Gráfica 15. Número total de mosquitos capturados en Doce de Octubre (DO). Las barras muestran el número total de mosquitos capturados en cada hora de muestreo, mientras que las líneas corresponden a la cantidad de mosquitos capturados en cada ecotopo.

7.3. Abundancia y tasa de picadura de *An. darlingi* en las áreas muestreadas

Teniendo en cuenta que *An. darlingi* fue el mosquito más frecuente en las comunidades muestreadas, se realizó la comparación de la media del número de individuos de esta especie, capturados por área, hora y ecotopo. Los resultados mostraron que Tp1 tiene la media más alta de mosquitos (media = 26,3; DE: 14,6) entre las áreas evaluadas, seguido por Tp2 (media=23,2; DE: 10,2) y DO (media= 6,4; DE:6,3) **Gráfica 9y Gráfica 11**).

La diferencia de la abundancia del vector por área de muestreo fue evaluada usando ANOVA, los resultados mostraron que el análisis de varianzas fue estadísticamente significativos. Usando la corrección de Bonferroni, test post-hoc nos muestra diferencias significativas entre el Tp1 y DO ($p=0,001$) y Tp2 y DO ($p=0,001$).

Asi mismo, se evaluó el tiempo en el cual *An. darlingi* fue más frecuente en cada área muestreada. Este análisis mostró que los mayores tiempos de presencia del mosquito en cada área fue sobre las 11:00 pm para Tp1 (media = 38,6, DE: 8,3) y las 9:00 pm para Tp2 (media = 30,6; DE: 12,4), finalmente

dos horas fueron reportadas en DO, a las 7:00 (media= 8,3; DE:11,0) y a las 8:00 pm (media= 8,3; DE:10,4) con las densidades más altas (**Gráfica 10**, **Gráfica 11** y **Gráfica 12**); un análisis de varianzas para establecer si existían diferencias entre las horas de toma y la zona de muestreo mostraron que esas medias fueron estadísticamente significativas ($p=0,001$; ANOVA test), y un test post-hoc usando la corrección de Bonferroni mostró diferencias significativas en la abundancia entre las tres horas muestreadas: 9:00pm en Tp1 y DO ($p=0,013$) y entre Tp2 y DO ($p=0,038$), 10:00 pm en Tp1 y DO ($p=0,010$), y 11:00 pm en Tp1 y DO ($p=0,010$).

Por otra parte, la densidad y tasa de picadura de acuerdo con el ecotopo de muestreo fue determinadas; el peridomicilio tuvo la media más alta de mosquitos capturados (media=31,0; DE 19,2), seguido de extradomicilio (media= 26,6; DE: 20,6) finalmente el ecotopo de menor de densidad fue el intradomicilio (media=1,1; DE:1,6) (**Gráfica 8**, **Gráfica 12**). Al evaluar el comportamiento de la media por ecotopo para cada comunidad muestreada, los resultados mostraron que el extradomicilio en Tp1 fue el ecotopo de mayor densidad (media=46,6; DE:19,1), seguido por el peridomicilio en Tp2 (media= 42,8; DE :12,7). La prueba de ANOVA para la densidad de mosquitos de cada ecotopo, mostrando resultados estadísticamente significativos para el peridomicilio ($p=0,0041$) y extradomicilio ($P=0,004$).

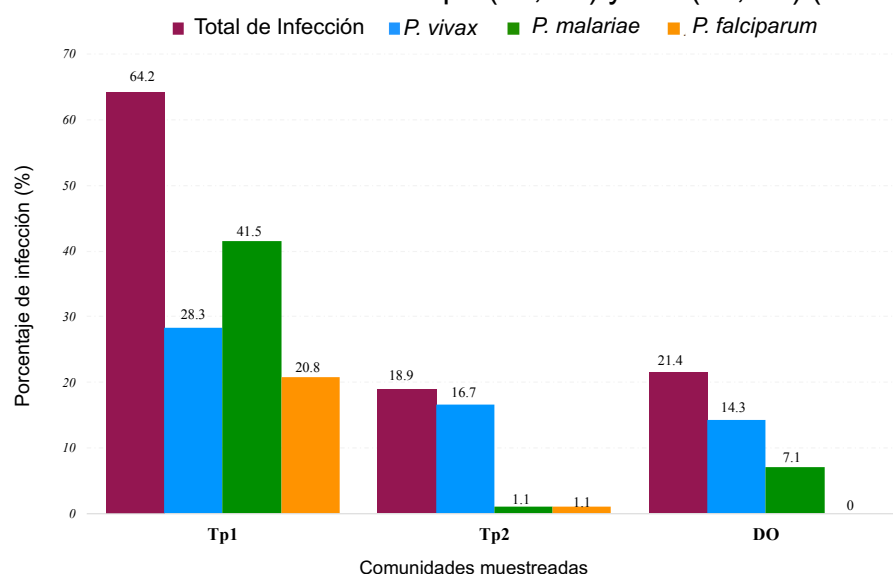
En este mismo contexto, se analizó de la hora de mayor abundancia para cada ecotopo, los resultados mostraron que para el peridomicilio la hora de mayor densidad fue las 8:00 pm (media=42,8; DE: 20,6), mientras que para extradomicilio se presentó a las 11:00 pm (media=40,6; DE: 36,6) (**Gráfica 12**); el análisis estadístico ANOVA, no muestra diferencias estadísticamente significativas.

7.4. Infección Natural y detección de especies de *Plasmodium*

La detección parasitaria se realizó empleando PCR, un total de 224 grupos de *An. darlingi* fueron analizados a través de la técnica, donde 106 pools correspondían a Tp1, 90 a Tp2 y 28 a DO. El ADN de *Plasmodium* fue detectado en 91 de los 224 pools analizados (40,6%: 34,1-47,3 95%CI); *P. vivax* fue la especie más frecuente ($n=49$, 21,9%), seguida de *P. malariae* ($n=47$, 21,0%) y *P. falciparum* ($n=23$, 10,3%) en menor proporción, esta distribución fue estadísticamente significativa ($p=0,001$).

Al evaluar las infecciones parasitarias de acuerdo a la comunidad muestreada los resultados mostraron que Tp1 fue la zona donde hubo mayor detección de *Plasmodium* ($n=68$, 64,2%) mientras que Tp2 fue la de menor prevalencia parasitaria ($n=17$, 18,9%) (**Gráfica 16**). En cuanto a la detección de las

especies parasitarias, *P. malariae* tiene la mayor prevalencia en Tp1 (n=44; 41,5%) siendo esta estadísticamente significativa (p=0,001), mientras que *P. vivax* tuvo la más alta frecuencia en Tp2 (16,7%) y DO (14,3%) (**Gráfica 16**).



Gráfica 16. Frecuencia relativa de infección por *Plasmodium spp* por comunidad muestreada.

Siete de los *pooles* analizados fueron del ecotopo de intradomicilio, siendo éste ecotopo el que presentó menor detección parasitaria (n=1, 14,3%), encontrando exclusivamente *P. vivax*; 115 *pooles* fueron analizados en el peridomicilio, 44 de ellos (38,3%) presentaron ADN del parásito, siendo *P. vivax* (n=29, 25,2%) la especie más representativa. En el ecotopo de extradomicilio se encontró que 46 de 102 *pooles* evaluados (45,1%) presentaron infección por *Plasmodium spp*, siendo *P. malariae* (n=28; 27,5%) la mas frecuente (**Gráfica 17**).

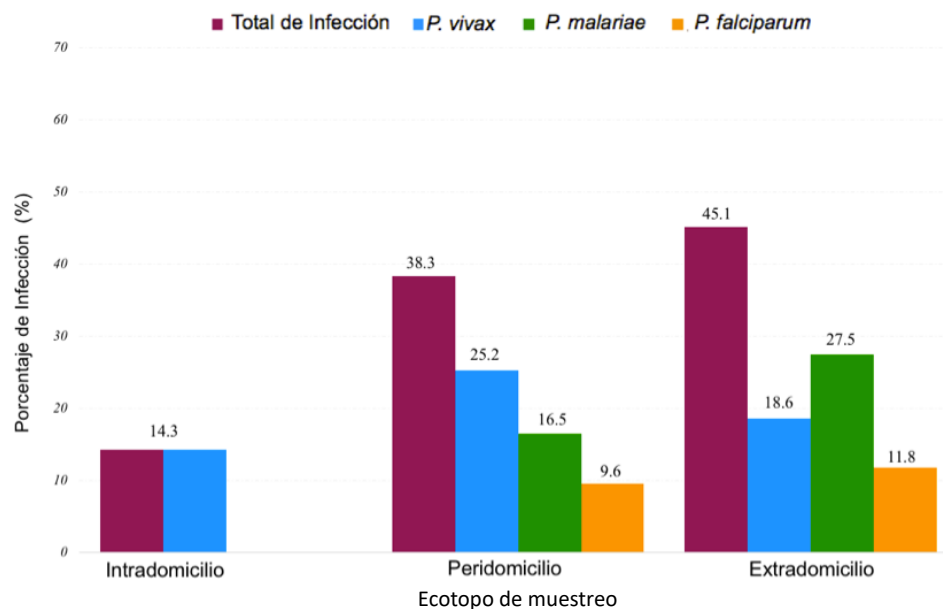
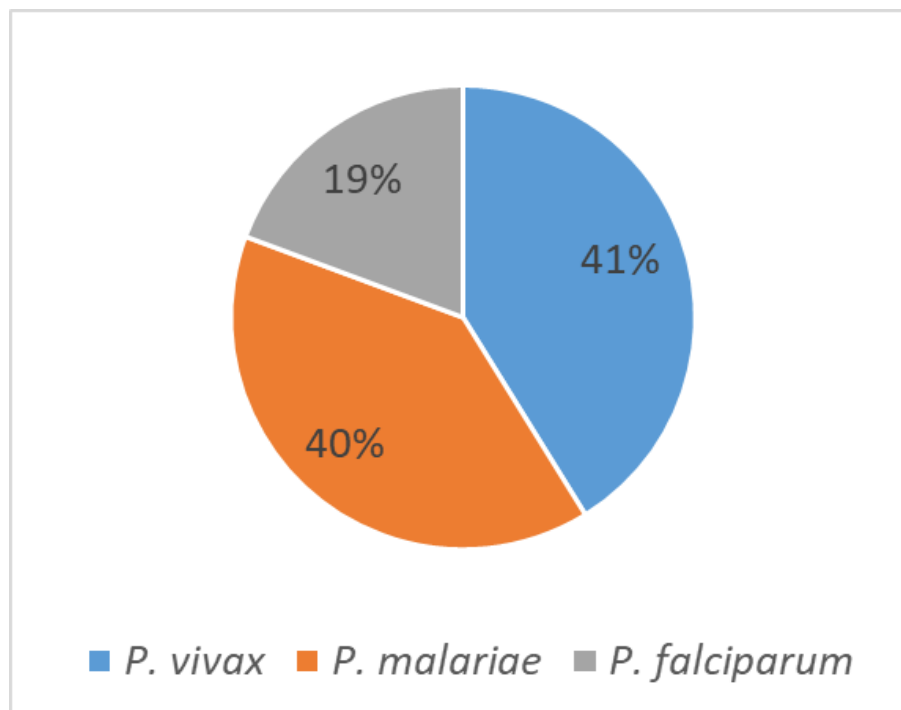


Gráfico 1.

Gráfica 17. Frecuencia relativa de *Plasmodium* spp, por ecotopo de muestreo.

En cuanto a las infecciones mixtas, 24 (26,4%) de ellos presentaron infección por mas de una especie parasitaria (**Gráfica 18**), la infección mixta de mayor aparición fue *P. vivax* y *P. malariae* (n=15; 16,5%) . Finalmente, al evaluar la presencia parasitaria en los 4 especímenes de *An. mattogrossensis* capturados, los resultados mostraron que en 2 (50%) de ellos el DNA parasitario fue detectado, siendo infectados exclusivamente con *P. vivax*.



Gráfica 18. Frecuencia de muestras de pools con presencia una, dos, y tres especies de Parásitos.

Análisis evolutivo del gen COI

El análisis del fragmento amplificado del gen COI de las 199 secuencias de *An. darlingi* mostró 40 SNPs en 596 bp analizadas. Tomando las secuencias obtenidas en la Amazonia Colombiana y las disponibles en GenBank del departamento de Córdoba como un solo set de datos (Colombia) se observaron solo 20 SNPs. Al analizar 15 secuencias provenientes de Brasil se observó 26 SPNs (**Tabla 3**).

En cuanto a la diversidad nucleotídica por sitio (π), los valores más altos se observaron en las secuencias provenientes de Brasil, seguida Córdoba, mientras las secuencias provenientes de la Amazonia mostraron el valor de π más bajo (**Tabla 3**). Los valores π fueron similares entre los sitios de muestreo.

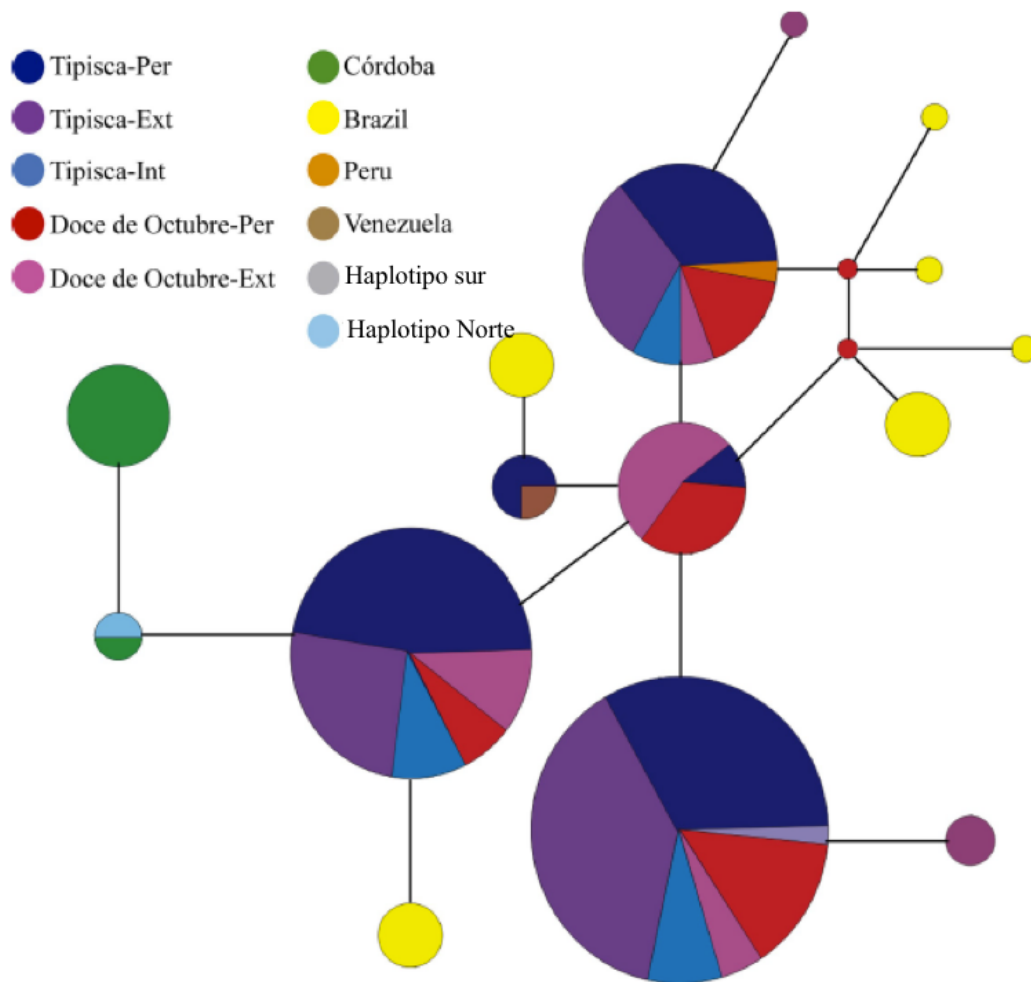
Tabla 3. Estimadores de Diversidad Genética

	Todos	Colombia	Amazonas	Tp	Tp Pe	Tp Ex	Tp In	DO	DO Pe	DO Ex	Córdoba	Brasil
N	231	210	199	145	69	61	15	52	29	23	11	15
SITIO	959	6060	666	666	666	666	666	666	666	666	606	643
Ss	40	20	22	13	13	11	10	19	12	15	8	26
S	21	9	8	2	3	3	2	7	2	5	7	12
Ps	19	11	14	11	10	8	8	12	10	10	1	14
H	35	18	28	9	8	5	5	21	12	14	7	14
Hd	0.800	0.764	0.770	0.699	0.756	0.615	0.771	0.895	0.949	0.949	0.873	0.990
π (DE)	0.00365 (0.0002)	0.00297 (0.0002)	0.0055 (0.0002)	0.00548 (0.0002)	0.00599 (0.0003)	0.00474 (0.0004)	0.005778 (0.0007)	0.00537 (0.0005)	0.00574 (0.0007)	0.00574 (0.0007)	0.00264 (0.0007)	0.01059 (0.0009)

N: cantidad de secuencias analizadas; Sitio: total de sitios analizados, excluyendo los gaps; Ss: total de sitios segregados; S: el total de los sitios sencillos; Ps: total se sitios parsimoniosos; H: Número de haplotipos; π : Diversidad de nucleotidos por sitio; DE: desviación estandar; Hd: Diversidad de haplotipos.

Abreviaciones: Tipisca (Tp); Tipisca peridomicilio (Tp Pe); Tipisca extradomicilio (Tp Ex); Tipisca intradomicilio (Tp In); Doce de Octubre (DO); doce de octubre peridomicilio (DO Pe); Doce de Octubre Extradomicilio (DO Ex).

Una red de haplotipos fue inferida para evaluar si la migración esta involucrada en la diversidad del locus del COI. Muchos haplotipos fueron compartidos entre poblaciones y subpoblaciones. Sin embargo, algunos haplotipos fueron restringidos a subpoblaciones particulares (**Gráfica 19**).



Gráfica 19. Median joining network. La gráfica muestra los haplotipos de COI identificados para los mosquitos recolectados en el amazonas colombiano, algunos haplotipos fueron incluidos dentro de otros haplotipos usando el algoritmo Contraction Star (125). para simplificar la interpretación de la red, cada nodo es un haplotipo y el tamaño de este indica la frecuencia. Las líneas conectan los haplotipos representativos, las diferentes rutas mutacionales, los median vectores son las secuencias ancestrales que explican la relación y el origen evolutivo.

8. DISCUSIÓN

La diversidad del género *Anopheles* en Colombia es ampliamente favorecido por una variedad de habitats, que proveen condiciones ambientales propicias para el desarrollo del mosquito, su dispersión y persistencia en los diferentes habitats (9,10,14,53). Diferentes vectores primarios se encuentran ampliamente distribuidos a través del territorio nacional, por lo que sus patrones de picadura y ecología varían de acuerdo a las condiciones propias de cada región, por lo que tales aspectos deben ser evaluados para cada población de manera tal que la información generada permita mejorar la eficiencia de las herramientas de prevención y control actualmente implementadas en nuestro país (126,127).

Los resultados del estudio mostraron una baja diversidad de Anophelinos en el área de muestreo comparada con la reportada en otros sitios de la región amazónica colombiana, donde 7 especies del subgénero *Nyssorhynchus* fueron encontradas (*An. Oswaldoi*, *An. nuneztovari*, *An. triannulatus*, *An. rangeli*, *An. neomaculipalpus*, *An. mattogrossensis*, *An. apimacula* y *An. peryassui*) (9,91,126). No obstante, estudios donde se han reportado una mayor diversidad corresponden a investigaciones llevada cabo en temporadas distintas y con tomas de muestra en una mayor periodicidad.

La dominancia de ciertas especies de anophelinos ha sido asociada con transformación del ambiente, especialmente en la región de amazonas brasileiro donde los cambios de estos ecosistemas ha sido reportado con tener un impacto directo en la presencia de otras especies de mosquitos de este género, algunas especies ha empezado a desaparecer por causa de la gran exposición a la luz o a la falta de plantas acuáticas frecuentes en los criaderos de los mosquitos, tales condiciones afectan el desarrollo de las formas inmaduras (128,129). La cantidad de mosquitos disminuyen gradualmente cuando tales periodos de transición aparecen, debido a la pérdida de áreas de desarrollo, o al retroceso de las lluvias y la disminución de los estanques naturales de aguas, causado por la inminente llegada de la temporada seca (9).

No obstante, en este estudio *An. darlingi* fue la especie dominante en los dos sitios de muestreo; este es consistente con previos reportes, que ha descrito esta especie como el vector primario en la región del Amazonas, debido a su marcada tendencia antropofílica, gran abundancia, alta capacidad endofágica y su susceptibilidad a las infecciones por las especies de *Plasmodium spp.* (128). Este vector ha sido descrito previamente como uno de los de mayor adaptabilidad a diversos hábitats, incluyendo las áreas intervenidas por actividades humanas (56,67,130).

Si bien no se encontró diversidad de especies de anofelino, los resultados reportaron una alta densidad de mosquitos, superior a lo previamente reportado, durante la misma época del año (9,57,130). Esto indica que en estas zonas del amazonas colombiano, existen hábitats adecuados que contribuyen a la aparición de grandes densidades del vector, por lo que se hace necesario la implementación de medidas de control poblacional interviniendo el hábitat durante la época seca antes de la llegada de la temporada de lluvias (131). En épocas de transición entre las lluvias y la sequía, las zonas inundables en la Amazonía se convierten en sitios de cría que son aprovechados por los anofelinos, auspiciando el incremento de su densidad de manera vertiginosa como se ha reportado en el caso de *An. darlingi*, la cual es una de las primeras especies que colonizan estos sitios (14,132) ya que es se adapta una diversidad de hábitats (133); lo anterior podría explicar la ausencia de otras especies de anofelinos.

Por otra parte, An. darlingi demostró un patrón de comportamiento exofágico en las áreas estudiadas, esto debido al hallazgo de la alta presencia en el peridomicilio y extadomicilio. La actividad de picadura fue constante durante la noche, con un pico a las 21:00 pm. Esa marcada presencia en los alrededores de los asentamientos humanos se ha discutido anteriormente y ha de estar determinada por diferentes variables como el uso de insecticidas en las casas, administrados por las estrategias de control de la zona, así como el uso de toldillos impregnados de alta duración (TILD), el tipo de construcción y el área en donde se realizó el muestreo (15,51,134). Esto resultados sugieren posibles cambios en el comportamiento de *An. darlingi*.

Reportes previos en muestreos de estas áreas muestran que este mosquito se comporta de forma endofágica, con una marcada actividad a de 6 a 11 pm; y de forma exofágica, con un pico de actividad a las 10:00 pm. Esta área es habitada por la étnica Ticuna y Huitoto la cual obtiene la sustentabilidad de la pesca y la agricultura y por lo general no se encuentran activos después de las 9:00 pm, aumentando la exposición del mosquito (9). La exofagia de *An. darlingi* sugiere, por nuestros resultados, que no se encuentra determinada por las costumbres de los habitantes. Investigaciones futuras se debe incluir información del comportamiento de la población, para poder determinar las relaciones entre el comportamiento del mosquito y la ocupación antrópica.

Adicionalmente, el comportamiento de picadura de *An. darlingi* en este estudio, puede estar asociado con la cercanía de las áreas de colección con la selva y la estructura de las viviendas. Se ha sugerido que estas viviendas construidas principalmente de madera, presentan gran número de agujeros y se construyen sin mallas de protección. Adicionalmente los habitantes de las zonas, tienen prácticas como minería o agricultura que favorecen la inducción de este anofelino a ser exofágico, debido a la facilidad del contacto que ofrecen entre el vector y el hombre (135,136).

Por otra parte, el análisis de la diversidad del marcador *COI* reveló que no hay diferencias en la estructura poblacional de los vectores colectados de acuerdo al área de muestreo, esto sugiere un considerable intercambio genético entre los mosquitos de *An. darlingi* de ambas comunidades, quizás causado por las condiciones ambientales y geográficas similares en Tipisca y Doce de Octubre. Estudios anteriores destacan la gran diversidad micro-genética por hábitat y por estación, algunas relacionadas a degradación forestal en áreas rurales cercanas a comunidades en Brasil y Perú que presentaron cambio abrupto de las condiciones ambientales afectando la tasa de reproducción, alimentación y supervivencia (137,138).

Aunque la abundancia de *An. darlingi* difiere en cada comunidad, no se encontró diferencias marcadas en la diversidad genética (evaluada por el gen *COI*) por lo que nuestros resultados sugieren que tales diferencias no son determinantes para la variación de la estructura poblacional de *An. darlingi*. Estudios previos han observado que la variación entre las poblaciones o comunidades destacan la cantidad de mosquitos que podrían, en parte, explicar por la plasticidad del comportamiento en respuesta a las variaciones ambientales de los sitios de muestreo (139).

Se observó que las secuencias obtenidas de la región del amazonas colombiano están relacionado con las del amazonas brasileño, de acuerdo con la estructura de la población con el marcador *COI*, y previos reportes de América Central y del Sur. Tales diferencias de la población de *An. darlingi* fue relacionada con el aislamiento debido a la distancia entre la población y los eventos geológicos que cual aisló los mosquitos de Centro América del resto de los anophelinos del Sur América (50).

Sin embargo, la similitud entre los haplotipos de Brasil y los obtenidos en este estudio pueden ser debidos a eventos demográficos y ecológicos que evitan la pérdida de identidad de los mosquitos (140). Nuestros resultados concuerdan con datos documentados previamente; una diferencia genética ha aparecido entre poblaciones colombianas de *An. darlingi* de las regiones del nor-oeste y de sur-este, las de las llanuras orientales de Colombia y la región amazónica colombiana están genéticamente más cerca de las poblaciones de otros países de América del Sur (110).

Por otra parte, las tres especies de *Plasmodium* reportados para Colombia fueron encontrados en las hembras de *An. darlingi* capturadas en la zona de estudio, así como en comunidades que viven en el norte de Brasil, en el sur de Venezuela y en la Guyana Francesa, con prevalencias de *P. malariae*, en las poblaciones estudiadas, más baja que las de *P. vivax* y *P. falciparum* (28,55,141). Nuestros resultados mostraron un alto porcentaje de infección de

P. malariae en las hembras de *An. darlingi*, lo que se observa en otros estudios epidemiológicos realizados en esta zona (60).

Previos estudios han propuesto una posible explicación a la baja probabilidad de encontrar *P. malariae* en mosquitos debido a su prolongado ciclo esporogónico en el intestino medio de las hembras, la cual puede durar hasta 3 semanas, disminuyendo la probabilidad que se produzcan hembras infectadas (142). Este aspecto biológico de *P. malariae* debe inducir falsos negativos en CPS-ELISA ya que este inmunoensayo depende directamente de la cantidad de antígeno en una muestra (143).

Técnicas moleculares tales como PCR ayuda a determinar la presencia de cualquier especie de *Plasmodium spp.* en Anophelinos con una gran precisión, ya que pequeñas cantidades del parásito pueden ser detectadas, contribuyendo al monitoreo y evaluación de la transmisión de la malaria (144). La alta prevalencia de infección de *Plasmodium sp.* en *An. darlingi* en áreas remotas donde los humanos están presentes sugieren que los mosquitos son altamente antropofílicos, que presentan una alta capacidad vectorial y pueden causar parasitemia asintomática (113).

No se han encontrado pruebas sólidas para clasificar la alta prevalencia de *P. malariae* como zoonosis en las áreas de estudio; sin embargo, vale la pena mencionar la alta frecuencia de hembras infectadas que se recolectan alrededor de las áreas exteriores de las casas (extradomiciliarias y peridomiciliarias) donde circulan los primates del Nuevo Mundo, dada la proximidad de las viviendas a la flora de la selva amazónica. Hay evidencia de hembras pertenecientes a la infección por *P. malariae* *An. fluminensis*, *An. pseudomaculilapus* y *An. maculipes* (145), en áreas del bosque atlántico brasileño donde los habitantes trabajan cerca de los bosques o hacen incursiones esporádicas, lo que lleva a especular que esta enfermedad se comporta como una zoonosis selvática, dado el escenario entomológico y los datos sociales recopilados hasta la fecha (145).

Por otro lado, *An. mattogrossensis*, especie encontrada en nuestro estudio, ha sido comúnmente colectado en la región amazónica en centros poblados de Perú, Brasil y Colombia (54,56,90). Su baja abundancia y preferencia zoofílica llevan a considerarlo como un vector no importante para la transmisión de malaria, aunque este puede ser encontrado infectado con *P. vivax* y *P. falciparum* en algunas localidades de Brasil. Este es el primer reporte en Colombia de la infección de *An. mattogrossensis* por parásitos productores de malaria (*P. vivax*) en humanos. Este vector, ha sido categorizados como un potencial reservorio de las especies de parásitos de malaria; tales hallazgos concuerdan con previos trabajos ya que su abundancia fue baja comparada con la de otras especies de anophelinos (11,54,132), este resultado sugiere que esta especie puede ser a futuro considerada para el monitoreo, y diseño

de futuros planes de control diseñados a garantizar la identificación de especies distintas a *An. darlingi*, tales como *An. mattogrossensis*, y así permitir la caracterización adecuada de diversas especies involucradas en la transmisión de la malaria en el Amazonas colombiano (90).

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La composición de las especies de Anophelinos en el área de estudio, nos muestra a *An. darlingi* como el más importante y potencialmente transmisor de la malaria, nuestros resultados indicaron alta abundancia de este vector en las comunidades muestreadas, adicionalmente las técnicas moleculares permitieron detectar gran porcentaje de infecciones parasitarias en los vectores, con capacidad a ser infectados por las tres especies evaluadas y que transmiten malaria en humanos.

Debido a la preferencia del vector por el peridomicilio y el extradomicilio, se debe plantear estudios para conocer la relación de este comportamiento con las medidas de control aplicadas, el cambio climático o por aspectos sociales propios de las comunidades muestreadas. Los habitantes de estas áreas presentan una relación de trabajo y vivienda con la selva amazónica la cual resulta en factores de riesgo favorecidos por los comportamientos de los anophelinos encontrados; algunas acciones de control y prevención deben ser tenidas en cuenta como el uso de LLINs, repelente personal, uso de insecticida y la búsqueda de criaderos efectivos para el uso de larvicidas para disminuir las densidades de *An. darlingi* (139).

De acuerdo con los hallazgos del presente trabajo, donde se encontró la presencia exofágica del vector *An. darlingi*, se debe establecer estrategias basadas en la disminución de las densidades poblacionales, como el control de criaderos en épocas de disminución del nivel de las aguas y el ordenamiento ambiental para aumentar la frontera entre el asentamiento humano con el bosque y así la barrera física entre ambos.

La detección de *P. vivax* en *An. mattogrossensis* es relevante para la planificación de las estrategias de prevención y control. Se debe realizar estudios para ampliar el conocimiento de la biología y ecología de *An. mattogrossensis* y entender el rol que puede tener en la transmisión de malaria en la zona. Al ser una especie de abundancia bajas y encontrarse en el extradomicilio su rol de vector se ve reducido, pero puede participar como reservorio de *Plasmodium* en otras épocas del año.

Una limitante del estudio fue que la recolección de los vectores se llevó a cabo solo por la tarde, y dado que el tiempo de picadura y alimentación difiere de una especie a otra, a futuro se deben plantear estudios donde se realice un monitoreo de las especies de mosquitos en una mayor periodicidad, tanto en horas de colecta, como en distintas épocas del año, y que permitan dar soporte a los resultados y conclusiones del presente trabajo.

Debido a la importancia de los hallazgos del presente estudio se debería realizar en otras comunidades y asentamientos de la Amazonía, donde no se tiene confirmación de las especies de anophelinos, ni de *Plasmodium* circulantes.

Los resultados del presente trabajo se publicaron en PlosOne

10. BIBLIOGRAFIA

1. White N, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM, et al. Malaria. Lancet [Internet]. 2014;383(9918):723–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613600240>
2. WHO. World Malaria Report. 2018. ISBN 978 92 4 156469 4. [Internet]. 2018. Available from: www.who.int/malaria
3. PAHO. Actualización Epidemiológica. Aumento de malaria en las Américas. 2018;5. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43437&lang=es
4. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Comportamiento de la notificación malaria 2018. Sem Boletín Epidemiológico [Internet]. 2019;(2). Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA_2018.pdf
5. Zambrano P. Malaria Protocolo de vigilancia en salud publica [Internet]. INS IN de S, editor. Colombia; 2017. 19 p. Available from: [https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud Pública/Ola invernal/Protocolo Vigilancia MALARIA.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud_Pública/Ola_invernal/Protocolo_Vigilancia_MALARIA.pdf)
6. OPS OP de la salud. Marco para la eliminación de la malaria [Internet]. Washington DC; 2017. 102 p. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34172/9789275319659-spa.pdf>
7. OMS. Estrategia Técnica Mundial Contra La Malaria 2016–2030. Organ Mund la Salud [Internet]. 2015;35. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/es/>
8. World Health Organization. Malaria control in humanitarian emergencies, an inter-agency feild handbook. 2013;1–220. Available from: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241548656/en/>
9. Rodriguez M, Perez L, Caicedo JC, Prieto G, Arroyo JA, Kaur H, et al. Composition and Biting Activity of Anopheles (Diptera: Culicidae) in the Amazon Region of Colombia. J Med Entomol. 2009;46(2):307–15.
10. Montoya-Lerma J, Solarte Y, Giraldo-Calderon G, Quiñonez M, Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, et al. Malaria vector species in Colombia: a

- review. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2011;106 Suppl(SUPPL. 1):223–38. Available from: [http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med7&NEWS=N&AN=21881778%0Ahttp://memorias.ioc.fiocruz.br/106\(spp\)/106_spp_2870.pdf%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=362362042](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med7&NEWS=N&AN=21881778%0Ahttp://memorias.ioc.fiocruz.br/106(spp)/106_spp_2870.pdf%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=362362042)
11. Tadei WP, Thatcher BD. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: anopheles of the subgenus Nyssorhynchus DB - LILACS DP - <http://www.globalhealthlibrary.net>. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2000;42(2):87–94. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652000000200005&lng=en&nrm=iso
12. Perez L, Suarez-Mutis M, Murcia L, De La Hoz F De, Olano VA, Brochero H, et al. La malaria en el Amazonas: conocimientos , prácticas , prevalencia de parasitemia y evaluación entomológica en mayo de 1997. 1999;19(2):93–102. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1012>
13. Salas DB. Informe final del evento Malaria. Colombia, 2016. Inst Nac Salud [Internet]. 2016;(1):1–28. Available from: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiológico/MALARIA 2016.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiol%C3%B3gico/MALARIA%202016.pdf)
14. Hiwat H, Bretas G. Ecology of Anopheles darlingi Root with respect to vector importance: A review. Parasites and Vectors [Internet]. 2011;4(1):1–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21923902>
15. Naranjo-Diaz N, Conn JE, Correa MM. Behavior and population structure of Anopheles darlingi in Colombia. Infect Genet Evol [Internet]. 2016;39:64–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.004>
16. Tadei WP, Thatcher BD, Santos J, Scarpassa V, Brandao I, Rafael M. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2017;99(2):325–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2715956>
17. Benavides-Melo JA. El cambio climático como determinante de la distribución de la malaria. Curare [Internet]. 2015;2. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/4ef8/fe19d9713f35d88b5edb72978f7ea0f7e943.pdf>

18. OMS, OMM, PNUMA. Cambio climático y salud humana - Riesgos y respuestas [Internet]. 2003. 40 p. Available from: <https://www.who.int/globalchange/publications/en/Spanishsummary.pdf>
19. OMS. Respuesta mundial para el control de vectores 2017 – 2030. 2017;Version 5. Available from: https://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf
20. INS I nacional de salud. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de malaria. 2012; Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/gestion-vigilancia-entomologica-malaria.pdf>
21. PNUD. Objetivos de Desarrollo Sostenible, Colombia. Herramientas de aproximación al contexto local [Internet]. 2015. 342 p. Available from: <https://www.undp.org/content/dam/colombia/docs/ODM/undp-co-ODSColombiaVSW-2016.pdf>
22. Roidriguez OC. Balance de los Objetivos del Milenio en Colombia. OASIS [Internet]. 2015;15:26. Available from: http://www.dane.gov.co/files/noticias/MESEP_2009.pdf.
23. Ministerio de Salud y Protección Social Colombia. Monitoreo a Los Objetivos De Desarrollo Del Milenio Principales Avances En Los Compromisos En Salud En Los Odm. Minist salud y protección Soc Colomb. 2014;1.
24. Ministerio de salud y la Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública. 2013;(32):2012–21. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos y Publicaciones/Plan Decenal - Documento en consulta para aprobación.pdf>
25. Ministerio de salud y la Protección Social. Resolución 3202 de 2016. 2016; Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-3202-de-2016.pdf>
26. Ministerio de Salud y Protección Social. Rutas integrales de atención en salud - RIAS. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/05-rias-presentacion.pdf>
27. Quiñonez ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton Y-M. Incrimination of Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli and An. (Nys.)

- oswaldoi as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(September):617–23.
28. Kardec R, Arruda M, Dálmeida R, Wirtz R, Lounibos P, Zimmerman R. Malaria Vector Incrimination in Three Rural Riverine Villages in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2018;76(3):461–9.
 29. Orjuela LI, Herrera M, Erazo H, Quiñones ML. Especies de Anopheles presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con Plasmodium. 2013;42–52.
 30. Gutierrez LA, Gonzales JJ, Gomez GF, Castro MI, Doris A, 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(8):1117–24.
 31. Oliveira MM. A Mobilidade humana na tríplice fronteira : Peru, Brasil e Colômbia. Estud Avancados. 2006;20(57):183–96.
 32. OMS, OPS. Alerta Epidemiológica Aumento de casos de malaria. 2017;2–7. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=38148&lang=es%0Ahttp://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=38148&lang=es
 33. Poveda G, Graham NE, Epstein PR, Rojas W, Quiñones ML, Velez ID, et al. Climate and ENSO variability associated with vector-borne diseases in Colombia. El Niño South Oscil Multiscale Var Glob Reg Impacts. 1999;177–98.
 34. Ministerio de salud y la Protección Social. Guía Para la Atención Clínica integral del Paciente con Malaria. 2010;1–129. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/Guia-atencion-clinica-malaria-2011.pdf>
 35. Padilla JC, Alvarez G, Montoya R, Chaparro P, Herrera S. Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2011;106:114–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881765>
 36. MINSALUD, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe del evento Malaria Colombia. 2017. 19 p.
 37. Chaparro P, Padilla J, Vallejo A, Herrera S. Characterization of a malaria

- outbreak in Colombia in 2010. *Malar J* [Internet]. 2013;12(1):1–11. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52784192%0Ahttp://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-330>
38. Salud IN de. *MALARIA: Informe de Evento, Colombia, Semestre I - 2018*. 2018;20.
 39. Colombia. 2015;2015.
 40. Recht J, Siquiera A, Monteiro W, Herrera S, Herrera S, Lacerda M. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 2017;16(1):1–19.
 41. Chaparro Narváez PE. Informe del Evento Paludismo, hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2012. 2012;(3):19.
 42. Restrepo CA. Informe final paludismo, año 2013. 2014;(3):25.
 43. S.Gomez. Instituto Nacional de Salud . Proceso vigilancia y analisis del riesgo en salud publica . Informe final Malaria Colombia 2014. 2014;(2):1–27.
 44. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento Malaria, Colombia, 2017. Inf del Even [Internet]. 2018;19. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA 2017.pdf>
 45. INS. Informe evento Malaria a periodo epidemiológico XIII-2018. 2018;3. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA PE XIII 2018.pdf>
 46. Davinson EA, De Araujo AC, Artaxo P, Balch JK, Brown IF, Bustamante MM, et al. The Amazon basin in transition. *Nature*. 2012;481(7381):321–8.
 47. Prieto-C A, Arias-G J. DIVERSIDAD BIOLÓGICA DEL SUR DE LA AMAZONIA COLOMBIANA. In: Instituto Alexander Von Humboldt., editor. Colombia-R. Bogotá D.C.; 2007. p. 184. Available from: http://www.corpoamazonia.gov.co/files/Planes/biodiversidad/diagnostico/AMAZONIA_C2.pdf
 48. MACEDO M, CASTELLO L. State of the Amazon: Freshwater Connectivity and Ecosystem Health State of the Amazon: Freshwater Connectivity and Ecosystem Health [Internet]. WWF. D. Oliveira CCM

and SC, editor. Brazil; 2015. 134 p. Available from: http://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/wwf_livingamazon_state_of_the_amazon_freshwaterconnectivity__links_web_eng.pdf

49. Ruiz S, Sanchez E, Tabares E, Prieto A, Arias J, Gomez R, et al. Diversidad biológica y cultural del sur de la Amazonia colombiana - Diagnóstico [Internet]. Corpoamazo. Bogotá D.C.; 2007. 636 p. Available from: <https://amazoniacolombiana.fiu.edu/wp-content/uploads/sites/14/2014/02/2007-Diagnostico-Biodiversidad-Sur-de-la-Amazonia-1.pdf>
50. Emerson KJ, Conn JE, Bergo ES, Randel MA, Sallum MAM. Brazilian *Anopheles darlingi* root (Diptera: Culicidae) clusters by major biogeographical region. PLoS One. 2015;10(7):1–15.
51. Vezegneho SB, Adde A, De Santi VP, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, et al. High malaria transmission in a forested malaria focus in French Guiana: How can exophagic *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention measures? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(9):561–9.
52. Pimenta PFP, Orofano AS, Bahia AC, Duarte APM, Rios-Velasquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. 2015;110(February):23–47.
53. Tadei WP, Thatcher BD. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000;42(2):87–94.
54. Reinbold-Wasson DD, Sardelis MR, Jones JW, Watts DM, Fernandez R, Carbajal F, et al. Determinants of *Anopheles* seasonal distribution patterns across a forest to periurban gradient near Iquitos, Peru. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(3):459–63.
55. Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Fouque F. *Anopheles darlingi* bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(7):702–10.
56. Vittor A, Pan W, Gilman R, Tielsch J, Glass G, Shields T, et al. Linking Deforestation to Malaria in the Amazon: Characterization of the Breeding Habitat of the Principal Malaria Vector, *Anopheles darlingi*. Am J Trop Med Hyg. 2013;10(1):54–6.
57. Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V, Vaccari E.

Malaria entomological inoculation rates in gold mining areas of Southern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(5):764–8.

58. DE Santi VP, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, et al. Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. *Malar J*. 2016;15(1):1–12.
59. Pova MM, Conn JE, Schlichting CD, Aamaral JCOF, Segura MNO, Silva ANM Da, et al. Malaria Vectors, Epidemiology, and the Re-Emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. *J Med Entomol*. 2009;40(4):379–86.
60. Camargo-Ayala PA, Cubides JR, Niño CH, Camargo M, Rrodriguez-Celis CA, Quiñonez T, et al. High plasmodium malariae prevalence in an endemic area of the colombian amazon region. *PLoS One*. 2016;11(7):1–17.
61. Camargo M, Leon SCS-D, Rios-Ospina L Del, Paez AC, Gonzalez Z, Gonzalez E, et al. Micro-epidemiology of mixed- species malaria infections in a rural population living in the Colombian Amazon region. *Nature*. 2018;8(5543):1–14.
62. Sinka M, Bangs M, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareoviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vector. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):1–11.
63. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol*. 2010;26(3):130–6.
64. Foster PG, Porangaba TM, Oliveira D, Bergo ES, Conn JE, Sant-Ana C, et al. Phylogeny of Anophelinae using mitochondrial protein coding genes Subject Category : Subject Areas : Author for correspondence : R Soc Open Sci. 2017;4(170758):1–20.
65. Gonzalez R, Carrejo NS. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Segunda. d. Cali: Universidad del Valle; 2009. 260 p.
66. Donnelly MJ, Simard F, Lehmann T. Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends Parasitol*. 2002;18(2):75–80.
67. Inka M, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil A, Temperley W, Gething P, et

- al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data,. *Parasit Vectors*. 2011;4:210–1.
68. Barros FSM, Honorio NA, Arruda ME. Mosquito Anthropophily: implications on malaria transmission in the northern Brazilian Amazon. *Neotrop Entomol*. 2011;39(6):1039–43.
 69. Manguin S. *Anopheles MOSQUITOES: New Insights into malaria Vectors*. MANGUIN S, editor. Croatia; 2013. 1–813 p.
 70. OMS PAHO. *Manual de Campo para la Vigilancia Entomológica de Anopheles*. 2013;28.
 71. WHO. *Malaria entomology and vector control*. 2013;193.
 72. USAID. *Training Manual on Malaria Entomology For Entomology and Vector Control Technicians Training Manual on Malaria Entomology For Entomology and Vector Control Technicians*. 2012;(September).
 73. Hernandez-Rivas R, Delgadillo D, Siera.Miranda J, Garcia-Tuanel G. *Parasitología Médica*. Mexico: MacGraw Hill Education; 2014. 147- p.
 74. Matuschewski K. Getting infectious: Formation and maturation of plasmodium sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell Microbiol*. 2006;8(10):1547–56.
 75. White NJ. *Plasmodium knowlesi: the Fifth Human Malarial Parasite*. *Emerg Infect* 9. 2014;46:261–71.
 76. Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. The *Plasmodium* bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):644–61.
 77. Krzysiminski J, Besansky NJ. *Molecular Systematics of Anopheles : From Subgenera to Subpopulations*. *Annu Rev Entomol*. 2002;48(1):111–39.
 78. Jaramillo-O N, Dujardin JP, Calle-Londoño D, Fonseca-Gonzalez I. Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) mosquitoes. *Med Vet Entomol*. 2015;29(1):26–36.
 79. Muragan K, Vavidalagan C, Karthika P, Panneerselvam C, Paulpandi M, Subramaniam J, et al. DNA barcoding and molecular evolution of mosquito vectors of medical and veterinary importance. *Parasitol Res*. 2016;115(1):107–21.

80. Garros C, Coetzee M, Koekemoer LL, Manguin S, Coosemans M. a Single Multiplex Assay To Identify Major Malaria Vectors Within the African *Anopheles Funestus* and the Oriental an. *Minimus* Groups. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;70(6):583–90.
81. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2015;44(1):01–7.
82. Ondrejicka DA, Locke SA, Morey K, Borisenko A V., Hanner RH. Status and prospects of DNA barcoding in medically important parasites and vectors. *Trends Parasitol* [Internet]. 2014;30(12):582–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.09.003>
83. Hebert PDN, Gregory TR. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst Biol.* 2005;54(5):852–9.
84. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3(5):294–9.
85. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2003;270(1512):313–21.
86. Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *R Soc London Ser B Biol Sci.* 2006;270(suppl_1):96–9.
87. Mckeen SN, Lehr MA, Wilkerson RC, Ruiz JF, Sallum MA, Lima JBP, et al. Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera : Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J* [Internet]. 2010;9(271):1–13. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/9/1/271%0ARESEARCH>
88. Scarpassa VM, Saulo A, Machado C, Saraiva JF. Evidence of new species for malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato in the Brazilian Amazon region. *Malar J.* 2016;15(205):1–16.
89. Gonzalez C, Molina AG, Leon C, Salcedo N, Rondon S, Paz A, et al. Entomological characterization of malaria in northern Colombia through vector and parasite species identification , and analyses of spatial distribution and infection rates. *Malar J.* 2017;16(431):1–11.
90. Gomez GF, Bickersmithh SA, Gonzalez R, Conn JE, Correa MM.

Molecular Taxonomy Provides New Insights into Anopheles Species of the Neotropical Arribalzagia Series. PLoS One. 2015;10(3):e0119488.

91. Ruiz F, Linton Y-M, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Qquñones ML, et al. Molecular comparison of topotypic specimens confirms Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(7):899–903.
92. Da Silva-Vasconcelos A, Neves Kató MY, Mourão EN, Lessa De Souza RT, Da Luz Lacerda RN, Sibajev A, et al. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(2):151–61.
93. Durnez L, Bortel W Van, Denis L, Roelants P, Veracx A, Trung HD, et al. False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. Malar J [Internet]. 2011;10(195):1–9. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/10/1/195>
94. Wirtz RA, Burkot TR, Graves PM, Andadre RG. Field evaluation of enzyme-linked immuosorbent assays for Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. J Med Entomol. 1987;24(4):433–7.
95. Bickersmith SA, Lainhart W, Moreno M, Chu VM, Vinetz JM, Conn JE. A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of plasmodium vivax and plasmodium falciparum infection in field-collected anophelines. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(4):573–6.
96. CDC. Methods in Anopheles. 4 Edition. Atlanta; 2014.
97. Alvarez N, Rosero D, Gomez G, Correa M. Detección de mosquitos Anopheles infectados naturalmente con Plasmodium spp . en Puerto Libertador , Córdoba ... 2012;(October).
98. Ryan JR, Dave K, Emmerich E, Garcia L, Yi L, Coleman RE, et al. Dipsticks for rapid detection of Plasmodium in vectoring Anopheles mosquitoes. Med Vet Entomol. 2001;15(2):225–30.
99. Collins KM, Hochberg L, Ryan JR, Dave K, Coleman RE, Dunton RF, et al. Extensive multiple test centre evaluation of the VecTest. Med Vet Entomol. 2002;16:321–7.

100. Achee NL, Grieco JP, Rejmankova E, Andre RG, Vanzie E, Polanco J, et al. Biting patterns and seasonal densities of *Anopheles* mosquitoes in the Cayo District, Belize, Central America with emphasis on *Anopheles darlingi*. *J Vector Ecol.* 2008;31(1):45–57.
101. Pova MM, Machado R, Segura M, Vianna G, Vasconcelos A, Conn J. Infectivity of malaria vector mosquitoes : correlation of positivity between ELBA and PCR-ELISA tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;94:106–7.
102. Pova MM, Wirtz RA, Lacerda RNL, Miles MA, Warhurst D. Malaria Vectors in the Municipality of Serra do Navio, State (Póvoa 2001.pdf. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(February):179–84.
103. Naranjo-diaz N, Rosero DA, Rua-uribe G, Luckhart S, Correa MM. Abundance , behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. 2013;1–11.
104. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snnounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A Genus and Specific Nested Polymerase Chain Reaction Malaria Detection Assay for Epidemiologic Studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(4):687–92.
105. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58(2):283–92.
106. Rocha M, Oliveira SB De, Pova MM, Moreira LA, Krettli U. Malaria Vectors in Areas of *Plasmodium falciparum* Epidemic Transmission in the Amazon Region , Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(6):872–7.
107. Rondon S, Leon C, Link A, Gonzalez C. Prevalence of *Plasmodium* parasites in non - human primates and mosquitoes in areas with different degrees of fragmentation in Colombia. *Malar J* [Internet]. 2019;18(276):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2910-z>
108. Rosero DA, Naranjo-Diaz N, Alvarez N, Ceinfuegos A V, Torres C, Luckhart S, et al. Colombian *Anopheles triannulatus* (*Diptera* : *Culicidae*) Naturally Infected with *Plasmodium* spp . *ISRN Parasitol.* 2013;2013.
109. Ahumada M, Pareja PX, Buitrago LS, Quiñonez ML. Comportamiento de picadura de *Anopheles darlingi* Root , 1926 (*Diptera* : *Culicidae*) y su

asociación con la transmisión de malaria en Villavicencio (Colombia). Biomédica. 2013;33(Suplemento 1):241–50.

110. Gutierrez LA, Gomez GF, Gonzalez JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, 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(1):38–47.
111. Jimenez 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.
112. Orjuela LI, Ahumada ML, Avila I, Herrera S, Beier JC, Quiñonez ML. Human biting activity, spatial – temporal distribution and malaria vector role of *Anopheles calderoni* in the southwest of Colombia. *Malar J.* 2015;14(256):1–9.
113. Vinetz JM, Peñataro P, Paredes M, Parker BS, Cardenas R, Capcha L, et al. Hyperendemic malaria transmission in areas of occupation-related travel in the Peruvian Amazon. *Malar J.* 2013;12(1):178.
114. Flores-Mendoza AC, Fernandez R, Escobedo-Vargas KS, Vela-Perez Q, Schoeler GB. Natural *Plasmodium* Infections in *Anopheles darlingi* and *Anopheles benarrochi* (Diptera : Culicidae) from Eastern Peru Natural *Plasmodium* Infections in *Anopheles darlingi* and *Anopheles benarrochi* (Diptera : Culicidae) from Eastern Peru. *J Med Entomol.* 2004;41(3):489–94.
115. Prussing C, Bickersmith SA, Moreno M, Saavedra MP, Alava F, Anice M, et al. *Nyssorhynchus dunhami*: bionomics and natural infection by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in the Peruvian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(12):1–8.
116. World Health Organization (WHO). Malaria entomology and Vector Control (Guide for Participants). *Train Modul Malar Control.* 2015;175 pp.
117. Mboera LEG. Sampling techniques for adult Afrotropical malaria vectors and their reliability. *Tanzanian Res Bull.* 2005;7(September):117–24.
118. Wilkerson RC, Strickman D, Hernandez-Salas I, Ibañez-Bernal S, Litwac T. Clave Ilustrada Para la Identificación de las Hembras de Mosquitos Anofelinos de México y Centroamérica.pdf. Secretaria. Mexico; 1993. 45 p.
119. Faran M, Linthicum K. Handbook of the Amazonian species of *Anopheles*

- (Nyssorhynchus) (Diptera, Culicidae). Mosq Syst [Internet]. 1981;13(1):1–81. Available from: <http://www.mosquitocatalog.org/files/pdfs/MS13N01P001.pdf>
120. Boehme P, Aamendt J, Zehner R. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. Parasitol Res. 2012;110(6):2325–32.
 121. Hall BG. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. Mol Biol Evol. 2015;(October):1–7.
 122. Librado P, Rozas J. DnaSP v5 : A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data DnaSP v5 : a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. BIOINFORMATICS. 2009;25(11):10–2.
 123. Morrison DA. Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. In: International J Parasitol. 2005;35:567–82.
 124. Looker M, Taylor-Robinson AW. A Protocol for a Highly Consistent , High Level Production in Vivo of Plasmodium falciparum Oocysts and Sporozoites. Advace Biocience Biotechnol [Internet]. 2014;5(November):985–93. Available from: <http://www.scirp.org/journal/abb>
<http://dx.doi.org/10.4236/abb.2014.513112%0AA>
 125. Forster P, Torroni A, Renfrew C, Ro A. Phylogenetic Star Contraction Applied to Asian and Papuan mtDNA Evolution. Mol Biol Evol. 2001;18(10):1864–81.
 126. Ahumada ML, Oorjuela LI, Pareja PX, Conde M, Cabarcas DM, Cubillos EFG, et al. Spatial distributions of Anopheles species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. Malar J. 2016;15(407):1–16.
 127. Cañon BA, Ahumada ML, Jara JA, Perez P, Conde M, Pareja PX, 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(1):1–14.
 128. Martins-Campos KM, Pinheiro WD, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Melo GC, Rodrigues ÍC, et al. Integrated vector management targeting Anopheles darlingi populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. Malar J. 2012;11(351):1–9.

129. Moutinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malar J* [Internet]. 2011;10(1):174. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/10/1/174>
130. Ries IC, Codeco CT, Camara DCP, Carvajar JJ, Pereira GR, Keppeler EC, et al. Diversity of *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) in an Amazonian Urban Area. *Neotrop Entomol*. 2018;47(3):412–7.
131. Chaves L, Bernal D, Rigg C, Calzada J, Dutary S, Koo S, et al. Population Dynamics of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) at Ipetí-Guna, a Village in a Region Targeted for Malaria Elimination in Panamá. *Insects*. 2018;9(4):164.
132. Marinho-E-Silva M, Sallum MAM, Rosa-Freitas MG, Lourenco-De-Oliveira R, Silva-Do-Nascimento TF. Anophelines species and the receptivity and vulnerability to malaria transmission in the pantanal Wetlands, central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(2):87–95.
133. Sánchez-Ribas J, Oliveira-Ferreira J, Gimnig JE, Pereira-Ribeiro C, Santos-Neves MSA, Silva-Do-Nascimento TF. Environmental variables associated with anopheline larvae distribution and abundance in Yanomami villages within unaltered areas of the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–15.
134. Fouque F, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Girod R. Annual variations in the number of malaria cases related to two different patterns of *Anopheles darlingi* transmission potential in the Maroni area of French Guiana. *Malar J*. 2010;9(1):1–15.
135. Souza-Santos R. Distribuição sazonal de vetores da malária Amazônica , Brasil Seasonal distribution of malaria vectors in Machadinho d ' Oeste , Rondônia State , Amazon Region , Brazil. *Cad Saude Publica*. 2002;18(6):1813–8.
136. Moreno JE, Rubio-Palis Y, Páez E, Pérez E, Sánchez V. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. *Med Vet Entomol*. 2007;21(4):339–49.
137. Moreno M, Chu VM, Vinetz JM, Lainhart W, Bickersmith SA, Ribolla PE, et al. Evidence for temporal population replacement and the signature of ecological adaptation in a major Neotropical malaria vector in Amazonian Peru. *Malar J*. 2015;14(1):1–17.

138. Campos M, Conn JE, Alonso DP, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–8.
139. Vinetz JM, Schlichting CD, Alava F, Moreno M, Emerson KJ, Bickersmith SA, et al. Decreasing proportion of *Anopheles darlingi* biting outdoors between long-lasting insecticidal net distributions in peri-Iquitos, Amazonian Peru. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2234-4>
140. Mirabello L, Vineis JH, Yanoviak SP, Scarpassa VM, Povia MM, 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(genotype 1):1–15.
141. Magris M, Rubio-Palis Y, Menares C, Villegas L. Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(3):303–11.
142. Collins WE, Jefferery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):579–92.
143. Bass C, Nikou D, Blagborough AM, Vontas J, Sinden RE, Williamson MS, et al. PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: A comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malar J*. 2008;7(177):1–9.
144. Rider MA, Byrd BD, Keating J, Wesson DM, Caillouet KA. PCR detection of malaria parasites in desiccated *Anopheles* mosquitoes is uninhibited by storage time and temperature. *Malar J*. 2012;11(193):1–6.
145. Laporta GZ, Nascimento M, Levy D, Akemi L, Marques T, De Oliveira P, et al. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? *Malar J* [Internet]. 2015;14(1):1–12. Available from: ???

11.ANEXOS

ANEXO 1. Socialización convenio 022 entre Instituto Colombiano de Inmunología (FIDIC) y la Gobernación del Amazonas



FIDIC – ESTACION EXPERIMENTAL DE PRIMATES
FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA
NIT 830084143-6

Leticia, 09 de Mayo de 2018

Doctor:
ANTONIO ALVARADO CABRERA
Becario Convenio Interinstitucional No. 000020/2014
Leticia.

Asunto: Remisión de documentación Previa Consulta y Socialización.

Cordial saludo.

Respetado Doctor Alvarado, acorde a su solicitud telefónica, estoy haciendo entrega de la documentación solicitada; inherente a los soportes administrativos de gestión ante las comunidades ubicadas e involucradas en la ejecución del Convenio Interinstitucional No. 0020 de 2014 denominado "Estrategias de prevención y control de la malaria, en respuesta al reciente brote de la enfermedad", suscrito entre la Gobernación de Amazonas y La Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC.

Es de aclarar que en vista de que el convenio en gran porcentaje pretendía controlar la propagación de la malaria, que en los últimos años iba en aumento exponencial y el trabajo a desarrollar era de manera conjunta con los órganos de salud pública del Departamento y los Municipios en el área de influencia, de que era premura el bienestar de la comunidad afectada por la enfermedad, de que la FIDIC contaba con la experiencia y operatividad para enfrentar la situación y que además, mantenía vigente la aceptación en previa consulta suscrita con las comunidades indígenas del zona, el derecho a desarrollar investigación en malaria. Así, se aprovecharon estas condiciones e inicio la ejecución del convenio No. 000020 de 2014 solo con la socialización de sus proyecciones ante la población y solicitándoles la participación necesaria para el éxito de lo proyectado; al considerar que sus fines mantenían la misma línea de investigación y objetivos destinados a enfrentar el flagelo de la malaria salvaguardando la salud pública en la región.

Sin otro particular diferente al ya expuesto, me despido; quedando atento a las observaciones que para bien tenga realizar.

Cordialmente;

EDGARDO GONZÁLEZ CARREÑO
ASADG – FIDIC – EEPL

Anexos:

Copia Acta de Previa Consulta FIDIC – Comunidades Indígenas, suscrita en el año 2009.
Copia Acta de Socialización del Convenio, suscrita en el mes de Mayo de 2015.
Copia del cierre de la Previa Consulta FIDIC – Comunidades Indígenas, Abril de 2018.

ANEXO 2.
Comité
de

Investigaciones Éticas (CEI) (Colombia: resolución CEI-ABN 026-0001061



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

Acreditación institucional de alta calidad
Ministerio de Educación Nacional
Evaluación internacional
Asociación Europea de Universidades

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN (CEI) ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD (EMCS) UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

MIEMBROS

RAMÓN FAYAD NAFFAH
FÍSICO Y MATEMÁTICO, PRESIDENTE

GLORIA CECILIA MONTERO HERRERA
TRABAJADORA SOCIAL, SECRETARIA

ALBERTO VELEZ VAN MIERCKE
MÉDICO - NEUROPEDIATRA

ANDRÉS FRANCISCO PINZÓN MANZANERA
ABOGADO, ESPECIALISTA EN DERECHO
ADMINISTRATIVO

ÁNGELA MARÍA RUIZ STERNBERG
MÉDICA - GINECO-OBSTETRA, EPIDEMIOLOGA

CARLOS ENRIQUE TRILLOS PEÑA
EPIDEMIOLOGO

CLAUDIA JULIANA BUITRAGO MARTÍN
MÉDICA INTERNISTA

LAURA DEL PILAR RICO LANVAZARAL
MÉDICA

LUISA FERNANDA RAMÍREZ
PSICÓLOGA

MARTHA ROCIO TORRES NARVAEZ
FISIOTERAPEUTA

PABLO ANDRÉS BERMÚDEZ
ESTUDIANTE DE MEDICINA

PABLO ENRIQUE MORENO MARTÍN
TRABAJADOR SOCIAL Y MAGISTER EN
ESTUDIOS DE LA FAMILIA

RICARDO ALVARADO SANCHEZ
MÉDICO SALUBRISTA

SERGIO ANDRÉS AMAYA
PSICÓLOGO Y MÉDICO

XIMENA PALACIOS ESPINOSA
PSICÓLOGA

YOLANDA DANIEL CASALLAS BUITRAGO
ADMINISTRADORA DE EMPRESAS, SECRETARIA
EJECUTIVA

CEI- ABN026- 0001061

Bogotá, 12 de mayo de 2014

Doctor

MANUEL ALFONSO PATARROYO

Investigador Principal

Protocolo: **"ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE MALARIA
EN EL AMAZONAS, EN RESPUESTA AL RECIENTE BROTE DE LA
ENFERMEDAD"**

Bogotá, D. C.

Respetado Doctor Patarroyo:

En reunión del día jueves 8 de mayo de 2014, el Comité de Ética en Investigación, mediante Acta No. 262, llevada a cabo a las 7:00 a.m. en la sala de juntas del CICUR, EMCS Quinta Mutis, a la que asistieron los siguientes miembros que cumplen el quórum mínimo deliberatorio de cinco personas.

- Ramón Fayad Naffah, Presidente.
- Gloria Montero Herrera, Secretaria Técnica.
- Martha Rocio Torres, Fisioterapeuta.
- Ximena Palacios, Psicóloga.
- Andrés Pinzón, Abogado especialista en Derecho Administrativo.
- Ricardo Alvarado, Médico Salubrista.
- Sergio Andrés Amaya, Médico y Psicólogo.
- Laura del Pilar Rico, Médica
- Mireya Mora, Representante de los estudiantes.
- Yolanda Casallas Buitrago, Administradora de Empresas, Secretaria Ejecutiva.

Se realizó la presentación de la comunicación emitida por usted el día 2 de mayo de 2014 donde adjunta los siguientes documentos con las correcciones solicitadas por el CEI:

- Protocolo de la Investigación.
 - Consentimiento Informado.
 - Asentimiento informado.
 - Carta Secretaria Técnica Ocad Regional centro sur Amazonía del SGR
- Declaración de acceso a material biológico.

Carrera 24 No. 63C-69 Quinta Mutis -
Teléfono: 3474570 Ext. 380-249
Fax: 3474570 Ext. 210



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

Acreditación institucional de alta calidad
Ministerio de Educación Nacional
Evaluación Internacional
Asociación Europea de Universidades

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN (CEI)
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD (EMCS)
UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

MIEMBROS

RAMÓN FAYAD NATTAH
FÍSICO Y MATEMÁTICO, PRESIDENTE

GLORIA CECILIA MONTERO HERRERA
TRABAJADORA SOCIAL, SECRETARÍA

ALBERTO VELÍZ SAN MARIANO
MÉDICO - NEUROPEDIATRA

ANDRÉS FRANCISCO PINZÓN MANTANERA
ABOGADO, ESPECIALISTA EN DERECHO
ADMINISTRATIVO

ÁNGELA MARIA RUIZ STERNBERG
MÉDICA - GINECO-OBSTETRA, EPIDEMIOLOGA

CARLOS ENRIQUE TRULLOS PEÑA
EPIDEMIOLOGO

CLAUDIA LILIANA BUTRAGO MARTÍN
MÉDICA INTERNISTA

LAURA DEL PILAR RICO LANDAZARAI
MÉDICA

LUISA FERNANDA RAMÍREZ
PSICÓLOGA

MARTHA ROCO TORRES NAVIAZ
FISIOTERAPEUTA

PABLO ANDRÉS BERNARDEZ
ESTUDIANTE DE MEDICINA

PABLO EMILIO MORENO MARTÍN
TRABAJADOR SOCIAL Y MAESTRO EN
GESTIÓN DE LA FAMILIA

RICARDO ALVARADO SÁNCHEZ
MÉDICO SALUBRISTA

SERGIO ANDRÉS AMAYA
PSICÓLOGO Y MÉDICO

XIMENA PALACIOS ESPINOSA
PSICÓLOGA

YOLANDA ISABEL CASALLAS BUTRAGO
ADMINISTRADORA DE EMPRESAS, SECRETARÍA
EJECUTIVA

Luego de haber tenido en cuenta las observaciones efectuadas, el Comité de Ética en Investigación, aprueba el protocolo y el consentimiento informado.

Queremos recordarle que debe entregar a este Comité los reportes de avance cada seis meses y de finalización.

Este Comité se rige por los lineamientos jurídicos y éticos del país a través de las resoluciones 008430 de 1993 y 002378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social. Igualmente, se siguen las normas contempladas en la declaración de Helsinki (Seúl, Corea 2008) y de la Conferencia Mundial de armonización para las Buenas Prácticas Clínicas.

Cordialmente,

RAMÓN FAYAD NATTAH
Presidente CEI
c.c. Archivo

Carrera 24 No. 63C-69 Quinta Mottis -
Teléfono: 3474570 Ext. 380-249
Fax: 3474570 Ext. 210

ANEXO 3. Acta No. 12 del 15 de noviembre de 2018 del Comité Institucional para la Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad de la Universidad CES (Comité de Ética de la Biodiversidad)

Acta N°12
Proyecto: Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su
significancia en la transmisión de malaria en comunidades
Indígenas del Amazonas Colombiano
Código del proyecto 011

Medellín, 15 de noviembre de 2018

Señor
ANTONIO ALVARADO CABRERA
antonioalvaradoc@gmail.com
Estudiante Maestría en Epidemiología
Universidad del Rosario – Universidad CES

Respetada señor Alvarado,

El Comité Institucional para la Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad de la Universidad CES (Comité de Ética de la Biodiversidad), revisó la información allegada a la Dirección de Investigación e Innovación, relacionada con el proyecto "Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano", identificado con el código de proyecto No. 011 y de acuerdo con los conceptos y opiniones de los miembros del comité expuestos durante la sesión, cuyo contenido explícito aparece en el acta correspondiente, se desprenden las siguientes consideraciones:

Objetivo General:

Identificar poblaciones de *Anopheles* spp, tipo y grado de infección por *Plasmodium* spp en zonas endémicas de malaria en los Municipios de Leticia y Puerto Nariño del Departamento de Amazonas, Colombia.

Observaciones:

Después de la revisión de la documentación enviada al Comité de Biodiversidad, se concluye que cumple con los lineamientos solicitados por el comité, relacionados con el cumplimiento de la normatividad en materia de recolección de especímenes de la diversidad biológica.

Conclusiones:

Una vez revisada la metodología y especies objeto de estudio del presente proyecto, el Comité Institucional para la Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad de la Universidad CES (Comité de Ética de la Biodiversidad), concluye que este cumple con los lineamientos éticos establecidos. Por consiguiente, el Comité

Daniela Gaviria Villada

Página 1 de 2

Acta N°12

Proyecto: Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su
significancia en la transmisión de malaria en comunidades
Indígenas del Amazonas Colombiano
Código del proyecto 011

Institucional para la Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad de la Universidad CES (Comité de Ética de la Biodiversidad), aprueba el proyecto por el tiempo que dure su ejecución.

Es función del comité, garantizar el cumplimiento de los compromisos éticos establecidos en el protocolo del proyecto aprobado. En virtud de lo anterior, el investigador principal se compromete a:

- Informar por escrito a los investigadores sobre la obligación que tienen de notificar oportunamente al comité: los eventos adversos serios que ocurran, las desviaciones mayores al protocolo, las fallas en la aplicación de las buenas prácticas, las violaciones a las normas que regulan el ejercicio de la actividad científica, las denuncias que hagan personas, participantes o no en el estudio, sobre fallas en la protección de los derechos o el bienestar de los organismos o el equilibrio de las poblaciones en los ecosistemas.
- Mantener la recolección restringida a los especímenes que sean recolectados en el marco del proyecto "Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano".
- Informar a la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales, los eventos de recolección de especímenes, previo a las salidas de campo.
- Entregar a la Dirección de Investigación e Innovación una copia digital o física de cada uno de los artículos publicados con los resultados del estudio aprobado.
- El comité podrá realizar, con el apoyo de sus miembros o de personas con experiencia e idoneidad, visitas de supervisión a los estudios en proceso de realización, con el fin de verificar el cumplimiento de los compromisos éticos.
- El comité podrá solicitar la suspensión temporal o definitiva del estudio, cuando concluya que los investigadores o los patrocinadores han incurrido en una falta grave a los principios y compromisos éticos durante la realización del estudio. Cuando sea necesario el comité notificará a la autoridad ambiental que le corresponda conocer la situación.

Atentamente,



JULIANA CARDONA-DUQUE
Coordinadora de Colecciones Biológicas
Presidente encargada
Universidad CES

Daniela Gaviria Villada

Página 2 de 2

ANEXO 4. Acta No. 99 del 29 de enero de 2019 del Comité Institucional de Ética de investigación en Humanos Universidad CES

Acta N° 99

Proyecto: "INFECCIÓN DE ANOPHELES SPP POR PLASMODIUM SPP Y SU SIGNIFICANCIA EN LA TRANSMISIÓN DE MALARIA EN COMUNIDADES INDÍGENAS DEL AMAZONAS COLOMBIANO."

Código del proyecto: 639

Segunda revisión



UNIVERSIDAD CES

Un compromiso con la excelencia

Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1175 del 27 de marzo de 2007

Medellín, 29 de enero de 2019

Doctor

LUIS ANTONIO ALVARADO CABRERA

antonioalvaradoc@gmail.com

Universidad CES

El Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES en su sesión número 99 del 8 de noviembre de 2016, sometió a consideración el proyecto "INFECCIÓN DE ANOPHELES SPP POR PLASMODIUM SPP Y SU SIGNIFICANCIA EN LA TRANSMISIÓN DE MALARIA EN COMUNIDADES INDÍGENAS DEL AMAZONAS COLOMBIANO.", cuyo investigador es el doctor Luis Antonio Alvarado Cabrera. El proyecto está adscrito al grupo de investigación Biología Molecular e Inmunología (BIOMOL).

El objetivo general del estudio es: Identificar poblaciones de Anopheles spp, tipo y grado de infección por Plasmodium spp en zonas endémicas de malaria en los Municipios de Leticia y Puerto Nariño del Departamento de Amazonas, Colombia.

En la evaluación del proyecto, participaron los siguientes miembros del Comité: Doctor Rubén Darío Manrique Hernández, Doctor Julián Emilio Vélez Ríos, Doctor Jorge Julián Osorio Gómez, Doctor John Wilson Osorio, Doctora Clara María Mesa Restrepo, Doctora Andrea Echavarría Arboleda, D, Dra. Mónica María Massaro Ceballos

De acuerdo con los conceptos y opiniones de los miembros del Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES, expuestos y sometidos a consideración durante la sesión descrita cuyo contenido explícito aparece en el acta correspondiente y luego de revisar el cumplimiento de los ajustes sugeridos a los investigadores, se desprende las siguientes consideraciones principales:

CONSIDERACIONES:

Una vez revisadas las correcciones y el cumplimiento de los requerimientos realizados por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES, se aprueba el proyecto para dar inicio.

CONCLUSIÓN:

www.ces.edu.co

Calle 10A No. 22-04 A.A. 054 501 Correo: 444 05 55 Fax: 266 60 46 NIT 898.984.862-8 Medellín / Colombia

Coordinadora



Una vez revisada la documentación, el comité concluye que el proyecto está ceñido a los principios éticos que regulan la investigación en seres humanos y que el equipo de investigación es idóneo para desarrollar el proyecto de acuerdo con los principios de validez y confiabilidad, por consiguiente, el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES APRUEBA el proyecto por el tiempo que dure su ejecución.

Es responsabilidad del Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES, garantizar el cumplimiento de los compromisos éticos establecidos en el protocolo del proyecto aprobado. En virtud de lo anterior, el investigador principal se compromete a:

- ✓ Informar por escrito a los investigadores sobre la obligación que tienen de notificar oportunamente al Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES: los eventos adversos serios que ocurran, las desviaciones mayores al protocolo, las fallas en la aplicación de las buenas prácticas clínicas, las violaciones a las normas que regulan el ejercicio de la actividad científica, las denuncias que hagan personas, participantes o no en el estudio, sobre fallas en la protección de los derechos o el bienestar de las personas, alertas sobre posibles fraudes o mala conducta científica en el estudio.
- ✓ Entregar a cada participante una copia del documento de consentimiento que haya firmado.
- ✓ Enviar al Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES, con la frecuencia que éste determine, copia del formato de entrega del consentimiento.
- ✓ Garantizar que no haya entre ellos y los testigos que firman el consentimiento informado, relaciones de primer grado de afinidad, segundo civil o cuarto de consanguinidad. De ello dejarán constancia en el mismo documento.

Además:

- ✓ El Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES podrá realizar, con el apoyo de sus miembros o de personas con experiencia e idoneidad, visitas de supervisión a los estudios en proceso de realización con el fin de verificar el cumplimiento de los compromisos éticos.
- ✓ El Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES podrá solicitar la suspensión temporal o definitiva del estudio cuando concluya que los investigadores o los patrocinadores han incurrido en una falta grave a los principios y compromisos éticos durante la realización del estudio. Cuando sea necesario el comité notificará a la autoridad de salud que le corresponda conocer la situación.

Se adjunta a esta comunicación, la versión final aprobada del consentimiento informado, esta es la versión que deberá utilizarse en el desarrollo de la investigación. Cualquier modificación que se haga deberá ser avalada por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES antes de su aplicación. De no ser así, será considerada una violación ética grave en el desarrollo de la investigación.

Acto N° 99

Proyecto: "INFECCIÓN DE ANOPHELES SPP POR PLASMODIUM SPP Y SU SIGNIFICANCIA EN LA TRANSMISIÓN DE MALARIA EN COMUNIDADES INDÍGENAS DEL AMAZONAS COLOMBIANO."

Código del proyecto: 639

Segunda revisión



UNIVERSIDAD CES

Un compromiso con la excelencia

Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007

Con la firma de recibido de este documento, los investigadores se comprometen a desarrollar el proyecto bajo las condiciones aprobadas en el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos Universidad CES.

RUBÉN DARIO MANRIQUE HERNÁNDEZ

Presidente

Comité de Ética en Investigación en Humanos Universidad CES.

comiteetichumanos@ces.edu.co

ANEXO 5. Consentimiento informado aceptado por el Comité de Ética de la Universidad CES

Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano

Municipio de Puerto Nariño y Leticia, Amazonas Colombia

**ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DEL ROSARIO**

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA (FIDIC)

APROBADO

29 ENE 2019
Comité Institucional
de ética en investigación
en humanos
Universidad CES

INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO

Le estamos invitando a participar en el estudio "**Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano**", que tiene el fin de identificar los tipos de mosquitos que transmiten la malaria y conocer los tipos de malaria que transportan estos mosquitos en los Municipios de Leticia y Puerto Nariño.

La malaria es la enfermedad transmitida por mosquitos más importante en el mundo. Hay varios tipos de malaria y todas se transmiten por la picada de los mosquitos.

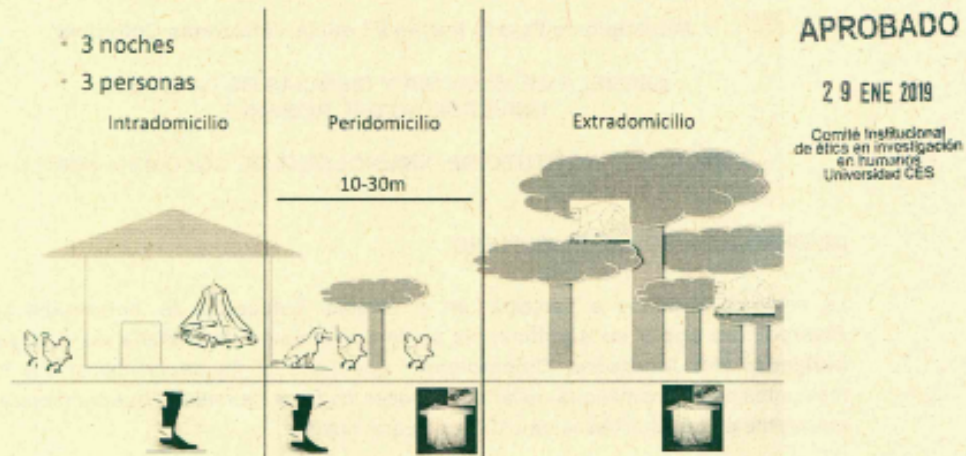
En Colombia hay siete mosquitos diferentes que actúan como transmisores principales pero en la zona amazónica existe una en especial, que por su alta preferencia de alimentarse de las personas la convierte en la más importante de la zona, sin embargo existen otros mosquitos que pueden transmitir malaria.

El desconocimiento de clases de mosquitos y de malaria que se encuentran en la región aumenta el problema de la vigilancia y el control de los casos de malaria en el departamento del Amazonas. Lo anterior hace que nos preguntemos sobre cuáles son las clases de mosquitos que están en la zona transmitiendo la malaria? Y, qué tipo de malaria están transmitiendo estos mosquitos? Resolver estas preguntas ayudará a programar estrategias adecuadas que permitan disminuir los casos de malaria en la región.

PROCEDIMIENTOS QUE SE REALIZARÁN EN LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se realizará en tres comunidades (en Municipios de Puerto Nariño y de Leticia) teniendo en cuenta la aparición de nuevos casos con respecto al número de habitantes (índice parasitario anual). En cada comunidad se realizará un muestreo de tres días, seleccionando las viviendas por conveniencia de acuerdo con las exigencias propias de campo. Las capturas de mosquitos en cada vivienda se realizarán de 6:00 pm a 12:00 am y se ubicará una persona en el intradomicilio, una persona en el peridomicilio y otra persona en el extradomicilio. Esta actividad se realizará durante 50 minutos consecutivos,

empezando cada hora en punto y con descansos de 10 minutos. Se utilizará el método de cebo humano protegido y trampas de luz Shannon, tal como se observa en la figura:



Para la captura mediante cebo humano se expondrá el pie del participante como atrayente de los mosquitos, el cual será recubierto con un calcetín o media de textura gruesa provista por el equipo de investigación. La parte expuesta se alumbrará con una linterna, revisando constantemente cualquier mosquito que se pose sobre la superficie. Para atrapar el mosquito, mientras se encuentra buscando un lugar donde alimentarse, se utilizará un tubo succionador, para luego depositarlo en el tarro colector, el cual deberá rotularse así:

Lugar:	Comunidad indígena
Sitio:	Intradomicilio (I)
	Peridomicilio (P)
	Extradomicilio (E)
Hora de captura:	6 pm (6-7)
	7 pm (7-8)
	8 pm (8-9)
	9 pm (9-10)
	10 pm (10-11)
	11 pm (11-12)

Después de la jornada diaria de captura, se procederá al embalaje del material colectado. Luego se almacenarán en una caja de icopor con pilas de hielo para su traslado, en cadena de frío, hasta Bogotá a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia para la realización de las pruebas moleculares.

RIESGOS

Usted, como una de las personas que se ha invitado a participar en las actividades del estudio, permitiendo la introducción del personal en su vivienda y la permanencia en ella y en los alrededores de 5 pm a 12:30 pm, tiempo en el cual se realizará la captura de mosquitos.

Este estudio se clasifica, de acuerdo a la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, como una investigación con un "Riesgo mínimo" para las personas que realizarán las capturas en campo. El estudio cuenta con los procedimientos para asegurar la atención en salud, en caso de requerirla por presentar sintomatología compatible con infección hasta 30 días después de realizada la actividad de riesgo.

BENEFICIOS

Su aporte es una contribución muy valiosa y necesaria para que los resultados, de investigaciones como ésta, permitan aportar estrategias adecuadas para el control y prevención de la malaria, en zonas endémicas como nuestras comunidades.

MANEJO DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA EN LA INVESTIGACIÓN

Se me garantiza un manejo ético, prudente y veraz de la información por parte del grupo de investigadores, la cual solo será utilizada con fines de investigación y para los propósitos descritos.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

En caso de cualquier inquietud, sugerencia o deseo de abandonar el estudio, Usted se puede comunicar con el Investigador principal del estudio:

Luis Antonio Alvarado
Estudiante de Maestría en Epidemiología de la Universidad del Rosario - CES
Calle 7 No. 6 – 50 Leticia
Cel. 3183695582

Esta investigación ha sido aprobada por el Comité Institucional de Ética para Investigación en Humanos (CIEI) de la Universidad CES.

APROBADO

29 ENE 2019

Comité Institucional
de ética en investigación
en humanos
Universidad CES

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Leí (o me fue leído), y he entendido la información sobre el estudio: "**Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano**" y tuve la oportunidad de hacer preguntas y de recibir respuestas satisfactorias para todas ellas. Mi participación es totalmente voluntaria y soy consciente que puedo abandonar el estudio en cualquier momento y por cualquier razón, sin que esta decisión me afecte en ningún sentido.

Como constancia de mi autorización para los procedimientos descritos en los cuales participaré, firmo a continuación,

Nombre _____ Dirección _____

Firma _____ Teléfono _____

CC _____

El investigador, con quien tuve oportunidad de dialogar sobre este estudio, y dos testigos también firman a continuación para dar constancia de ello,

APROBADO

29 ENE 2019

Nombre Investigador **Luis Antonio Alvarado Cabrera**

Comité Institucional
de ética en investigación
en humanos
Universidad CES

Firma _____

CC **15.876.909 de Leticia Amazonas**

Nombre testigo 1 _____ Firma _____

CC _____

Nombre testigo 2 _____ Firma _____

CC _____

Leticia, Amazonas, día _____, del mes de _____, del año _____.

ANEXO 6. Consentimiento informado firmado por los participantes del proyecto

Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano

Municipio de Puerto Nariño y Leticia, Amazonas Colombia

**ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DEL ROSARIO**

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA (FIDIC)

APROBADO

29 ENE 2019

Comité Institucional
de Ética en Investigación
en Humano
Universidad CES

INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO

Le estamos invitando a participar en el estudio "Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano", que tiene el fin de identificar los tipos de mosquitos que transmiten la malaria y conocer los tipos de malaria que transportan estos mosquitos en los Municipios de Leticia y Puerto Nariño.

La malaria es la enfermedad transmitida por mosquitos más importante en el mundo. Hay varios tipos de malaria y todas se transmiten por la picada de los mosquitos.

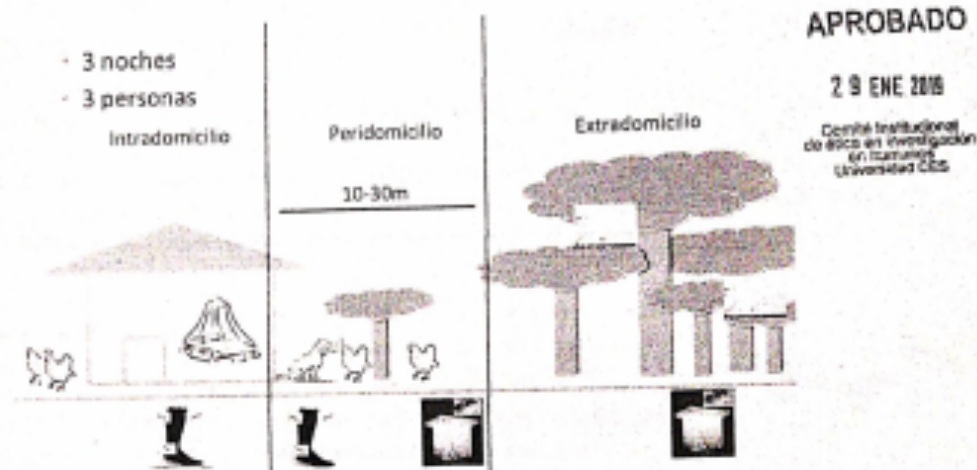
En Colombia hay siete mosquitos diferentes que actúan como transmisores principales pero en la zona amazónica existe una en especial, que por su alta preferencia de alimentarse de las personas la convierten en la más importante de la zona, sin embargo existen otros mosquitos que pueden transmitir malaria.

El desconocimiento de clases de mosquitos y de malaria que se encuentran en la región aumenta el problema de la vigilancia y el control de los casos de malaria en el departamento del Amazonas. Lo anterior hace que nos preguntemos sobre cuáles son las clases de mosquitos que están en la zona transmitiendo la malaria? Y, qué tipo de malaria están transmitiendo estos mosquitos? Resolver estas preguntas ayudará a programar estrategias adecuadas que permitan disminuir los casos de malaria en la región.

PROCEDIMIENTOS QUE SE REALIZARAN EN LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se realizará en tres comunidades (en Municipios de Puerto Nariño y de Leticia) teniendo en cuenta la aparición de nuevos casos con respecto al número de habitantes (Índice parasitario anual). En cada comunidad se realizará un muestreo de tres días, seleccionando las viviendas por conveniencia de acuerdo con las exigencias propias de campo. Las capturas de mosquitos en cada vivienda se realizarán de 6:00 pm a 12:00 am y se ubicará una persona en el intradomicilio, una persona en el peridomicilio y otra persona en el extradomicilio. Esta actividad se realizará durante 50 minutos consecutivos.

empezando cada hora en punto y con descansos de 10 minutos. Se utilizará el método de cebo humano protegido y trampas de luz Shannon, tal como se observa en la figura:



Para la captura mediante cebo humano se expondrá el pie del participante como atrayente de los mosquitos, el cual será recubierto con un calcetín o media de textura gruesa provista por el equipo de investigación. La parte expuesta se alumbrará con una linterna, revisando constantemente cualquier mosquito que se pose sobre la superficie. Para atrapar el mosquito, mientras se encuentra buscando un lugar donde alimentarse, se utilizará un tubo succionador, para luego depositarlo en el tarro colector, el cual deberá rotularse así:

Lugar:	Comunidad indígena	
Sitio:	Intradomicilio	(I)
	Peridomicilio	(P)
	Extradomicilio	(E)
Hora de captura:	6 pm (6-7)	
	7 pm (7-8)	
	8 pm (8-9)	
	9 pm (9-10)	
	10 pm (10-11)	
	11 pm (11-12)	

Después de la jornada diaria de captura, se procederá al embalaje del material colectado. Luego se almacenarán en una caja de icopor con pilas de hielo para su traslado, en cadena de frío, hasta Bogotá a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia para la realización de las pruebas moleculares.

RIESGOS

Usted, como una de las personas que se ha invitado a participar en las actividades del estudio, permitiendo la introducción del personal en su vivienda y la permanencia en ella y en los alrededores de 5 pm a 12:30 pm, tiempo en el cual se realizará la captura de mosquitos.

Este estudio se clasifica, de acuerdo a la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, como una investigación con un "Riesgo mínimo" para las personas que realizarán las capturas en campo. El estudio cuenta con los procedimientos para asegurar la atención en salud, en caso de requerirla por presentar sintomatología compatible con infección hasta 30 días después de realizada la actividad de riesgo.

BENEFICIOS

Su aporte es una contribución muy valiosa y necesaria para que los resultados, de investigaciones como ésta, permitan aportar estrategias adecuadas para el control y prevención de la malaria, en zonas endémicas como nuestras comunidades.

MANEJO DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA EN LA INVESTIGACIÓN

Se me garantiza un manejo ético, prudente y veraz de la información por parte del grupo de investigadores, la cual solo será utilizada con fines de investigación y para los propósitos descritos.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

En caso de cualquier inquietud, sugerencia o deseo de abandonar el estudio, Usted se puede comunicar con el investigador principal del estudio:

Luis Antonio Alvarado
Estudiante de Maestría en Epidemiología de la Universidad del Rosario - CES
Calle 7 No. 6 – 50 Leticia
Cel. 3183695582

Esta investigación ha sido aprobada por el Comité Institucional de Ética para Investigación en Humanos (CIEI) de la Universidad CES.

APROBADO

29 ENE 2013

Comité Institucional
de Ética en Investigación
en Humanos
Universidad CES

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Leí (o me fue leído), y he entendido la información sobre el estudio: "Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano" y tuve la oportunidad de hacer preguntas y de recibir respuestas satisfactorias para todas ellas. Mi participación es totalmente voluntaria y soy consciente que puedo abandonar el estudio en cualquier momento y por cualquier razón, sin que esta decisión me afecte en ningún sentido.

Como constancia de mi autorización para los procedimientos descritos en los cuales participaré, firmo a continuación,

Nombre Luis Henry Pabón Dirección Cr 7 # 10-84
Firma Luis Pabón Teléfono 3142055487
CC 86051459

El investigador, con quien tuve oportunidad de dialogar sobre este estudio, y dos testigos también firman a continuación para dar constancia de ello,

APROBADO

29 ENE 2019

Nombre Investigador Luis Antonio Alvarado Cabrera

Firma
CC

Luis Antonio Alvarado
15.876.909 de Leticia Amazonas

Comité Institucional
de Ética en Investigación
en Humano
Universidad CES

Nombre testigo 1 Jennifer Ros Firma Jennifer Ros
CC 1130605224

Nombre testigo 2 Juan Carlos Gorda U Firma Juan Carlos Gorda U
CC 1051808555

Leticia, Amazonas, día 25 del mes de febrero, del año 2019.

Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano

Municipio de Puerto Nariño y Leticia, Amazonas Colombia

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA (FIDIC)

APROBADO

29 ENE 2019

Comité Institucional
de Ética en Investigación
en Humanos
Universidad CES

INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO

Le estamos invitando a participar en el estudio "Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano", que tiene el fin de identificar los tipos de mosquitos que transmiten la malaria y conocer los tipos de malaria que transportan estos mosquitos en los Municipios de Leticia y Puerto Nariño.

La malaria es la enfermedad transmitida por mosquitos más importante en el mundo. Hay varios tipos de malaria y todas se transmiten por la picada de los mosquitos.

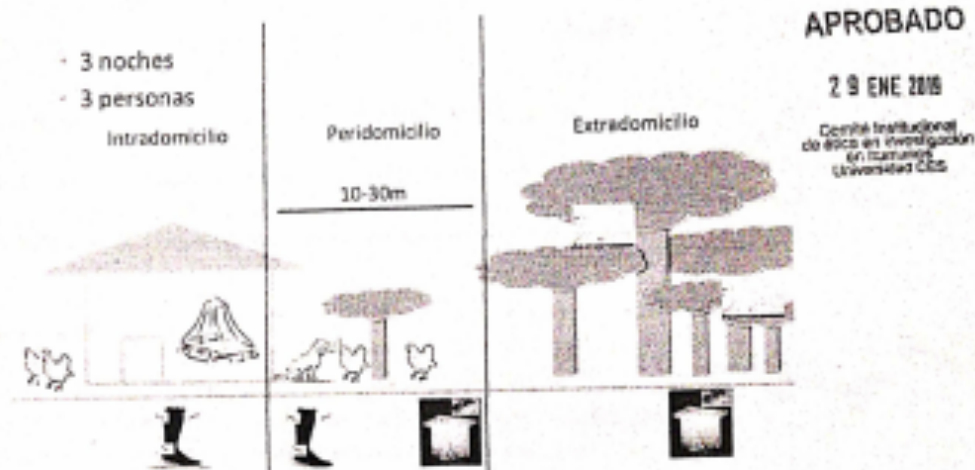
En Colombia hay siete mosquitos diferentes que actúan como transmisores principales pero en la zona amazónica existe una en especial, que por su alta preferencia de alimentarse de las personas la convierten en la más importante de la zona, sin embargo existen otros mosquitos que pueden transmitir malaria.

El desconocimiento de clases de mosquitos y de malaria que se encuentran en la región aumenta el problema de la vigilancia y el control de los casos de malaria en el departamento del Amazonas. Lo anterior hace que nos preguntemos sobre cuáles son las clases de mosquitos que están en la zona transmitiendo la malaria? Y, qué tipo de malaria están transmitiendo estos mosquitos? Resolver estas preguntas ayudará a programar estrategias adecuadas que permitan disminuir los casos de malaria en la región.

PROCEDIMIENTOS QUE SE REALIZARAN EN LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se realizará en tres comunidades (en Municipios de Puerto Nariño y de Leticia) teniendo en cuenta la aparición de nuevos casos con respecto al número de habitantes (Índice parasitario anual). En cada comunidad se realizará un muestreo de tres días, seleccionando las viviendas por conveniencia de acuerdo con las exigencias propias de campo. Las capturas de mosquitos en cada vivienda se realizarán de 6:00 pm a 12:00 am y se ubicará una persona en el intradomicilio, una persona en el peridomicilio y otra persona en el extradomicilio. Esta actividad se realizará durante 50 minutos consecutivos.

empezando cada hora en punto y con descansos de 10 minutos. Se utilizará el método de cebo humano protegido y trampas de luz Shannon, tal como se observa en la figura:



Para la captura mediante cebo humano se expondrá el pie del participante como atrayente de los mosquitos, el cual será recubierto con un calcetín o media de textura gruesa provista por el equipo de investigación. La parte expuesta se alumbrará con una linterna, revisando constantemente cualquier mosquito que se pose sobre la superficie. Para atrapar el mosquito, mientras se encuentra buscando un lugar donde alimentarse, se utilizará un tubo succionador, para luego depositarlo en el tarro colector, el cual deberá rotularse así:

Lugar:	Comunidad indígena
Sitio:	Intradomicilio (I)
	Peridomicilio (P)
	Extradomicilio (E)
Hora de captura:	6 pm (6-7)
	7 pm (7-8)
	8 pm (8-9)
	9 pm (9-10)
	10 pm (10-11)
	11 pm (11-12)

Después de la jornada diaria de captura, se procederá al embalaje del material colectado. Luego se almacenarán en una caja de icopor con pilas de hielo para su traslado, en cadena de frío, hasta Bogotá a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia para la realización de las pruebas moleculares.

RIESGOS

Usted, como una de las personas que se ha invitado a participar en las actividades del estudio, permitiendo la introducción del personal en su vivienda y la permanencia en ella y en los alrededores de 5 pm a 12:30 pm, tiempo en el cual se realizará la captura de mosquitos.

Este estudio se clasifica, de acuerdo a la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, como una investigación con un "Riesgo mínimo" para las personas que realizarán las capturas en campo. El estudio cuenta con los procedimientos para asegurar la atención en salud, en caso de requerirla por presentar sintomatología compatible con infección hasta 30 días después de realizada la actividad de riesgo.

BENEFICIOS

Su aporte es una contribución muy valiosa y necesaria para que los resultados, de investigaciones como ésta, permitan aportar estrategias adecuadas para el control y prevención de la malaria, en zonas endémicas como nuestras comunidades.

MANEJO DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA EN LA INVESTIGACIÓN

Se me garantiza un manejo ético, prudente y veraz de la información por parte del grupo de investigadores, la cual solo será utilizada con fines de investigación y para los propósitos descritos.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

En caso de cualquier inquietud, sugerencia o deseo de abandonar el estudio, Usted se puede comunicar con el investigador principal del estudio:

Luis Antonio Alvarado
Estudiante de Maestría en Epidemiología de la Universidad del Rosario - CES
Calle 7 No. 6 – 50 Leticia
Cel. 3183695582

Esta investigación ha sido aprobada por el Comité Institucional de Ética para Investigación en Humanos (CIEI) de la Universidad CES.

APROBADO

29 ENE 2013

Comité Institucional
de Ética en Investigación
en Humanos
Universidad CES

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Leí (o me fue leído), y he entendido la información sobre el estudio: "Infección de *Anopheles* spp por *Plasmodium* spp y su significancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas Colombiano" y tuve la oportunidad de hacer preguntas y de recibir respuestas satisfactorias para todas ellas. Mi participación es totalmente voluntaria y soy consciente que puedo abandonar el estudio en cualquier momento y por cualquier razón, sin que esta decisión me afecte en ningún sentido.

Como constancia de mi autorización para los procedimientos descritos en los cuales participaré, firmo a continuación,

Nombre CABRERA A. BENJIFO Dirección CP6 N° 10-82
Firma [Firma] Teléfono 3123885412
CC 15.878.633 LEI.

El investigador, con quien tuve oportunidad de dialogar sobre este estudio, y dos testigos también firman a continuación para dar constancia de ello,

APROBADO

29 ENE 2019

Comité Institucional
de ética en investigación
en Salud
Universidad CES

Nombre Investigador Luis Antonio Alvarado Cabrera

Firma

CC

[Firma]
15.876.909 de Leticia Amazonas

Nombre testigo 1 Jennifer Rios Firma [Firma]
CC 1130605224

Nombre testigo 2 Juan Camilo Rozales N Firma [Firma]
CC 1.057.802.555

Leticia, Amazonas, día 25, del mes de Febrero, del año 2019.

Anexo 7. Artículo generado y publicado en este estudio



RESEARCH ARTICLE

Behavior and abundance of *Anopheles darlingi* in communities living in the Colombian Amazon riverside

César Camilo Prado^{1*}, Luis Antonio Alvarado-Cabrera^{2*}, Paola Andrea Camargo-Ayala¹, Diego Garzón-Ospina^{1,3}, Milena Camargo^{1,3}, Sara Cecilia Soto-De León¹, Juan Ricardo Cubides¹, Carmen Teresa Celis-Giraldo⁴, Manuel Elkin Patamayo^{1,5}, Manuel Alfonso Patamayo^{1,6}

1 Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia, **2** MSc Programme in Epidemiology, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia, **3** PhD Programme in Biomedical and Biological Sciences, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia, **4** Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), Bogotá, Colombia, **5** School of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, **6** Basic Sciences Department, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

* These authors contributed equally to this work.

* mapatam@fidi.co



OPEN ACCESS

Citation: Prado CC, Alvarado-Cabrera LA, Camargo-Ayala PA, Garzón-Ospina D, Camargo M, Soto-De León SC, et al. (2019) Behavior and abundance of *Anopheles darlingi* in communities living in the Colombian Amazon riverside. PLoS ONE 14(3): e0213335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213335>

Editor: David J. Sullivan, Jr., Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health, UNITED STATES

Received: September 24, 2018

Accepted: February 20, 2019

Published: March 7, 2019

Copyright: © 2019 Prado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: The project entitled, "Strategies for malaria prevention and control in the Amazonas region in response to the recent outbreak of the disease" was sponsored by the Amazonas region's Governor's office and financed with resources from Colombia's Royalties System and the Colombian

Abstract

In the past few years, relative frequencies of malaria parasite species in communities living in the Colombian Amazon riverside have changed, being *Plasmodium vivax* (51.4%) and *Plasmodium malariae* (43.8%) the most frequent. Given this epidemiological scenario, it is important to determine the species of anophelines involved in these parasites' transmission. This study was carried out in June 2016 in two indigenous communities living close to the tributaries of the Amazon River using protected human bait. The results of this study showed a total abundance of 1,085 mosquitos, of which 99.2% corresponded to *Anopheles darlingi*. Additionally, only two anopheline species were found, showing low diversity in the study areas. Molecular confirmation of some individuals was then followed by evolutionary analysis by using the COI gene. Nested PCR was used for identifying the three *Plasmodium* species circulating in the study areas. Of the two species collected in this study, 21.0% of the *An. darlingi* mosquitos were infected with *P. malariae*, 21.9% with *P. vivax* and 10.3% with *Plasmodium falciparum*. It exhibited exophilic and exophagic behavior in both study areas, having marked differences regarding its abundance in each community (Tipisca first sampling 49.4%, Tipisca second sampling 39.6% and Doce de Octubre 10.9%). Interestingly, *An. mattogrossensis* infected by *P. vivax* was found for the first time in Colombia (in 50% of the four females collected). Analysis of *An. darlingi* COI gene diversity indicated a single population maintaining a high gene flow between the study areas. The *An. darlingi* behavior pattern found in both communities represents a risk factor for the region's inhabitants living/working near these sites. This highlights the need for vector control efforts such as the use of personal repellents and insecticides for use on cattle, which must be made available in order to reduce this Anopheline's abundance.