



Boletín

de Malariología
y Salud Ambiental

Ministerio del Poder Popular para la Salud



Ciencias

Físicas



Biológicas



Sociales



ISSN: 1690 - 4648
Depósito Legal: pp-200303AR314

Vol. LV, N° 2, 2015

Maracay - Aragua - Venezuela

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. LV, N° 2, Agosto-Diciembre, 2015

ISSN: 1690 - 4648 - DEPÓSITO LEGAL pp- 200303AR314

(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD	HENRY VENTURA MORENO MINISTRO
VICEMINISTERIO DE SALUD INTEGRAL	ASIA VILLEGAS VICEMINISTRA
DIRECTOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y EDUCACIÓN PARA LA SALUD INTEGRAL	MAIQUI FLORES DIRECTOR
SERVICIO AUTÓNOMO INSTITUTO DE ALTOS ESTUDIOS “DR. ARNOLDO GABALDON”	PEDRO TÉLLEZ DIRECTOR

Editores

Darjaniva Molina P. de Fernández

M. Dora Feliciangeli

José Vicente Scorza

Secretaría Técnica

José Romero (IAE-MPPS)

Diseño y Diagramación

Oswaldo Flores S. (IAE-MPPS)

Comité Editorial

Roberto Briceño León (LaCSO-FaCES-UCV)

Rafael Cásares (Fac. Agronomía-UCV)

Oscar Feo (Fac. Ciencias de la Salud-UC)

Oscar Noya (Inst. Med. Trop.-UCV)

Yasmín Rubio-Palis (UC-MPPS)

Jorge Ernesto Moreno (IAE-MPPS)

Magda Magris (CAICET)

Julio Castro (Inst. Med. Trop.-UCV)

Luis Pérez (Fac.Cs.Salud-UC)

Comité Honorario

Jorge Alvar (España)

Lenea María Campino (Portugal)

José R. Coura (Brasil)

Philippe Desjeux (Francia)

Felipe Guhl (Colombia)

Santiago Mas Coma (España)

César Náquira (Perú)

Carlos Ponce (Honduras)

Antonieta Rojas de Arias (Paraguay)

Christopher Schofield (Reino Unido)

Rodrigo Zeledón (Costa Rica)

Omar Verde (Venezuela)

Mario Henry Rodríguez (México)

Para envío de artículos: bolmal2015@gmail.com

Para canje: mpps.iae.dgi@gmail.com

Apartado de Correos N° 2171. Maracay 2101. Estado Aragua, Venezuela.

Revista indizada en **Latindex**, **Lilacs**, **IMBIOMED**, **Global Health**,
Zoological Record, **WEB Science Citation Index Expanded 2010**,
y pertenece a la colección **SciELO Venezuela**.

Publicada por el Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”,
ubicado en la Av. Bermúdez Sur, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Esta revista está editada “on line” en la dirección: www.iaes.edu.ve

Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Vol. LV, N° 2

Maracay, Aragua, Venezuela

Agosto-Diciembre, 2015

CONTENIDO

ARTÍCULOS ORIGINALES

Caracterización de hábitats larvales de anofelinos en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela

Characterization of anophelines larval habitats in the municipality of Sifontes, Bolívar State, Venezuela

Jorge E. Moreno, Yasmin Rubio-Palis, Víctor Sánchez & Ángela Martínez 117

Taxonomía molecular de *Anopheles* del Ecuador mediante ADN mitocondrial (Citocromo c Oxidasa I) y optimización por Parsimonia Máxima

Molecular Taxonomy of Anopheles from Ecuador, using mitochondrial DNA (Cytochrome c Oxidase I) and Maximum Parsimony optimization

Gabriela Arregui, Sandra Enriquez, Washington Benítez-Ortiz & Juan-Carlos Navarro. 132

Intervención educativa paramodificar conocimientos, actitudes y prácticas sobre la malaria en escolares indígenas Ye'kwana

Educational intervention to modify knowledge, attitudes and practices about malaria in Ye'kwana schools

Mariapia Bevilacqua, Luis Gonzalo Morales, Lya Cárdenas & José Domínguez 155

Persistencia en la competencia vectorial de *Aedes albopictus* de Venezuela a una cepa asiática dengue 2

Vector competence persistence of Venezuelan Aedes albopictus for an Asian dengue-2 strain

Yda Mendez, Marifel Carrozza, Darjaniva Molina P. de Fernández, Karen Flores & Flor Herrera 165

Estado de la resistencia a insecticidas organosintéticos de *Aedes aegypti* de Coro, estado Falcon, Venezuela

Status of resistance to organo-synthetic insecticides by an Aedes aegypti strain from Coro, Falcon state, Venezuela

Danny Bastidas Beltrán, Luisa Figueroa Acosta, Enrique Pérez Pinto & Darjaniva Molina Picón de Fernández 173

Aislamiento de parásitos intestinales en la cucaracha americana (<i>Periplaneta americana</i>) en Coro, estado Falcón, Venezuela <i>Isolation of intestinal parasites from American cockroach (Periplaneta americana) in Coro, Falcon state, Venezuela</i>	
Dalmiro Cazorla Perfetti, Pedro Morales & Patricia Navas	184

NOTAS CIENTÍFICAS

Inventario preliminar de anofelinos (Diptera: Culicidae) en áreas endémicas de malaria, municipios Atures y Autana, estado Amazonas, Venezuela <i>Preliminary survey of anophelines (Diptera: Culicidae) in an endemic area of malaria (Atures and Autana municipalities), Amazonas State, Venezuela</i>	
Edith Navarro, María Eugenia Grillet, Cristóbal Menare, Julio Gonzalez & Hortencia Frontado	194
Mordedura de ciempiés (Chilopoda) en humanos: un registro de cuatro casos en México <i>Centipede (Chilopoda) bite in humans: a report of four cases in Mexico</i>	
Fabio Germán Cupul-Magaña, Herminio Terán-Flores, Julián Bueno-Villegas & Armando H. Escobedo-Galván	199

REVISTA DE REVISTAS	204
----------------------------------	-----

NOTICIAS	207
-----------------------	-----

LISTA ACUMALADA POR AUTORES	208
--	-----

LISTA ACUMALADA POR MATERIAS	210
---	-----

LISTA DE ARBITROS	212
--------------------------------	-----

Artículos Originales

Caracterización de hábitats larvales de anofelinos en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela

Characterization of anophelines larval habitats in the municipality of Sifontes, Bolívar State, Venezuela

Jorge E. Moreno^{1*}, Yasmin Rubio-Palis^{2,3}, Víctor Sánchez² & Ángela Martínez⁴

RESUMEN

El municipio Sifontes, ubicado en el noreste del estado Bolívar, constituye el principal foco de malaria de Venezuela. Durante el quinquenio 2010-2014, se registró en el municipio un aumento considerable de la morbilidad con una fuerte tendencia al incremento, cerrando 2014 con la cifra record de 51.603 casos, 58% de la malaria del país en el año. Con el objeto de estudiar la distribución espacial de las larvas de anofelinos en los hábitats acuáticos y su relación con las variables ambientales, se hicieron colectas mensuales de larvas en hábitats representativos de los diferentes tipos existentes en la zona, entre septiembre 2002 y diciembre 2003. El Análisis de Correspondencia Canónica (CANOCO) indica que a nivel de hábitat (humedal), la presencia de las especies de *Anopheles* está determinada por el tipo y la dinámica hídrica del hábitat, mientras que a nivel de microhábitat (cucharonazo) las especies se ubican a lo largo de un gradiente dominado por el tipo de vegetación, y en menor grado por la luz solar y el color aparente del agua. Esto permitió establecer grupos de especies *a priori*, tales como las del subgénero *Nyssorhynchus*, asociadas a la luz solar y a ciertas plantas acuáticas, o las de los subgéneros *Anopheles* y *Stethomyia*, *An. (Lophopodomomyia) squamifemur* y *Chagasia bonneae* asociadas a ambientes sombreados y carentes de vegetación. Los resultados ayudan a comprender mejor la relación de las especies de anofelinos con el medio ambiente y resaltan la importancia de variables como la dinámica hídrica, luz solar, vegetación y color aparente del agua para determinar su ocurrencia en el hábitat acuático.

Palabras clave: *Anopheles albitarsis* s.l., *Anopheles darlingi*, *Anopheles braziliensis*, *Anopheles nuneztovari* s.l., *Anopheles oswaldoi* s.l., *Anopheles triannulatus* s.l., CANOCO.

SUMMARY

The Municipality of Sifontes, located in the northeast of Bolivar State, is the main malaria foci in Venezuela. A considerable increase in malaria morbidity was recorded in the Municipality during the decade 2010-2014, with a record figure of 51.603 cases for 2014, 58% of the malaria for the country. In order to study the spatial distribution of anopheline immature stages in the larval habitats and its relation to environmental variables, monthly collections were carried out in larval habitats representatives of the different types present in the area between September 2002 and December 2003. The Canonic Correspondance Analysis (CANOCO) showed that at the larval habitat level the *Anopheles* species is determined by the type and dynamics of the habitat, while at the microhabitat level (dip) the species are located along a gradient dominated by the type of vegetation, and in a lesser degree by the exposure to sun light and apparent water color. These allowed to established group of species *a priori*, such as those of the subgenus *Nyssorhynchus* associated to sun light and certain aquatic plants, or the subgenus *Anopheles* and *Stethomyia*, *An. squamifemur* and *Chagasia bonneae* associated to shaded environments and lack of vegetation. The results help to understand the relationship of anopheline species with the environment and the importance of variables such as water dynamics, sun light, vegetation and water apparent color to determine its occurrence in the larval habitat.

Key words: *Anopheles albitarsis* s.l., *Anopheles darlingi*, *Anopheles braziliensis*, *Anopheles nuneztovari* s.l., *Anopheles oswaldoi* s.l., *Anopheles triannulatus* s.l., CANOCO.

¹ Centro de Investigaciones de Campo "Dr. Francesco Vitanza", Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" (MPPS). Tumeremo, estado Bolívar. Venezuela.

² Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" (MPPS). Maracay, estado Aragua. Venezuela.

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo, Maracay, estado Aragua. Venezuela.

⁴ Instituto de Salud Pública del Estado Bolívar, Ciudad Bolívar, estado Bolívar. Venezuela.

* Autor de correspondencia: joreremo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El municipio Sifontes del estado Bolívar, es considerado el principal foco endémico de malaria en Venezuela. Durante el quinquenio 2010-2014, se originaron en promedio 35.819 casos anuales, con una fuerte tendencia al incremento, cerrando 2014 con la cifra record de 51.603 casos, 58% de la malaria del país en el año [Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), 2014]. El crecimiento de la malaria en este municipio en los últimos años, pudiera estar asociado a la minería artesanal de oro, debido a la deforestación y alteración de la hidrología superficial que provoca, propiciando la aparición de nichos adecuados para la reproducción de anofelinos (Grillet *et al.*, 2014).

En esta zona, se han llevado a cabo algunos estudios de ecología de larvas de anofelinos. Uno de ellos es el de Berti *et al.* (1998), quienes en un inventario preliminar reportaron 10 especies de *Anopheles* Meigen, entre las cuales destaca *An. (Nyssorhynchus) darlingi* Root considerado el vector principal de malaria en la región. A partir de 1998, se han venido realizando una serie de trabajos de investigación en esta área que han permitido recopilar datos acerca de la identidad, bionomía y ecología de las especies de *Anopheles* presentes en el área, tanto de larvas como de adultos (Moreno, 2000; Moreno *et al.*, 2000; 2007; 2009; 2015). Al respecto, Moreno *et al.* (2000) reportaron la presencia en el área de 12 especies de *Anopheles*, estando entre las especies más abundantes, en orden decreciente, *An. (Nyssorhynchus) triannulatus* Neiva y Pinto *sensu lato*, *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch Arribalzaga *s.l.* (= *An. marajoara* Galvão y Damasceno) y *An. darlingi*, correspondiendo a la primera especie 68% del material colectado. Luego fue anexada *An. (Anopheles) costai* (Fonseca & Ramos) a la lista de especies presentes en el área y posteriormente *An. nuneztovari s.l.* (Moreno & Rubio-Palis, 2003; Moreno *et al.*, 2004). Asimismo, Moreno *et al.* (2000) describieron los principales tipos de hábitats acuáticos de anofelinos en la zona, concluyendo que las lagunas y las charcas producidas por la actividad minera constituían los principales hábitats para *An. albitarsis s.l.* y *An. darlingi*, especies involucradas en la transmisión de malaria (Moreno *et al.*, 2009).

Sin embargo, aún persisten muchos aspectos desconocidos sobre la ecología de las especies de

anofelinos en el área, debido, entre otras cosas, a las dificultades para obtener muestras suficientemente grandes de especies como *An. darlingi*, lo que ha limitado las oportunidades de estudio (Charlwood, 1996). Por tal razón, en este trabajo se explora la asociación entre la abundancia y la distribución de las larvas de anofelinos en el hábitat y el microhábitat, con las características ambientales de los hábitats acuáticos, mediante el uso de técnicas de análisis multivariado, con la finalidad de aprovechar su valor predictivo de la presencia de las especies; aspecto que ha sido investigado previamente en Venezuela por Rejmánková *et al.* (1999), especialmente en lo referente a su relación con la vegetación acuática dominante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de hábitats acuáticos de anofelinos

En el lapso comprendido entre septiembre 2002 y diciembre 2003 se realizó un muestreo en trece hábitats acuáticos de anofelinos de seis tipos diferentes, ubicados a lo largo de la transecta formada por la carretera troncal 10 que cruza el municipio de norte a sur. Las características y tipos de hábitats muestreados, así como el paisaje, la ecología y demografía del municipio han sido previamente descritos (Moreno *et al.*, 2007; 2010; 2015). En cada uno de los hábitats se hizo un muestreo cada mes durante 16 meses, tomándose 30 muestras no aleatorias en seis puntos diferentes del hábitat seleccionado de acuerdo a criterio de experto, con un cucharón de cono truncado de 1,5 L de capacidad. Se tomó registro *in situ* en cada muestreo de las variables ambientales más importantes, tales como el grado de exposición solar del hábitat, dinámica hídrica e hidropериodo. De acuerdo a la exposición solar se categorizaron los hábitats en: totalmente sombreados, parcialmente sombreados o totalmente soleados; en cuanto a la dinámica hídrica se clasificaron en hábitats estancados, de corriente lenta y corriente rápida; y según el hidropериodo en: permanentes, si contenían agua durante todo el año; estacionales, si solo conservan agua durante la temporada de lluvias; y temporales, si solo contienen agua durante pocos días (Grillet *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2015). Asimismo, el color aparente del agua fue registrado en tres categorías cualitativas apreciadas visualmente: agua marrón, con mucho material sólido en suspensión; agua color ámbar, rica en materia orgánica y agua

crystalina (Moreno *et al.*, 2015). También se midieron algunas variables físico-químicas tales como pH, conductividad, temperatura y sólidos disueltos totales (SDT) al momento del muestreo, utilizándose para el registro de las variables físico-químicas un equipo portátil M-90 CheckmateSM de Corning Inc. La presencia de vegetación acuática fue cuidadosamente registrada, haciéndose una estimación visual del porcentaje de cobertura del hábitat y de los tipos dominantes, identificándolas a nivel de familia y género, o especie en algunos casos de plantas muy comunes (Moreno *et al.*, 2015).

Identificación de especies de anofelinos

Debido a la presencia en los hábitats de más de una especie, el contenido de cada cucharón fue observado individualmente, lo cual permitió la identificación previa de los especímenes *in vivo*, mediante la observación con lente de 10x en microscopio compuesto, de caracteres taxonómicos conspicuos en larvas de IV estadio que caracterizan a cada una de estas especies, y que permiten identificarlas con facilidad mediante el uso de claves taxonómicas (Faran & Linthicum, 1981; Navarro, 1996). De esta forma, basándose en el conocimiento previo que se tiene sobre la fauna anofelina en los hábitats incluidos en el estudio, se identificaron las principales especies del subgénero *Nyssorhynchus* Blanchard y de otros subgéneros de *Anopheles*, previamente reportadas por Moreno *et al.* (2000). En los casos dudosos, la larva viva fue desarrollada hasta la fase adulta para la confirmación de la identidad de la especie mediante la aplicación de técnicas de colección asociada, según la metodología descrita por Belkin *et al.* (1965).

Análisis multivariado

Mediante el programa MVSP versión 3.13 (Copyright© 1985-2007 Kovach Computing Services), se realizó un Análisis de Correspondencia Canónica (CANOCO) (ter Braak & Smilauer, 1998) con variables seleccionadas previamente para extraer la máxima variación explicada por las variables ambientales y determinar la ubicación ecológica óptima, que favorece la ocurrencia y abundancia de las especies. El set de variables de especies estuvo constituido por datos cuantitativos de abundancia de 11 especies de anofelinos colectadas durante el estudio, entre las cuales se incluyeron especies no

identificadas de los subgéneros *Anopheles* Meigen y *Stethomyia* Theobald. El set de variables ambientales estuvo constituido por 35 variables, de las cuales 17 describen las características físicas del hábitat y su dinámica hídrica e hidroperíodo, cuatro las físico-química del agua y 13 son variables de vegetación hidrófila y detrito. Las características físicas del hábitat y la vegetación están constituidas por variables dicotómicas de presencia y ausencia codificados con uno y cero respectivamente, mientras que las variables físico-químicas están constituidas por mediciones cuantitativas expresadas en las unidades naturales de cada variable.

Los datos fueron organizados en dos matrices correspondientes a dos escalas espaciales diferentes. En primer lugar, una matriz en la cual la unidad de muestreo fue el hábitat positivo (escala de hábitat), conformada por 166 casos, estando las variables de especie representadas por el promedio de larvas colectadas en 30 cucharonazos (réplicas), y las variables ambientales representadas por las características abióticas del hábitat, tales como tipo, dinámica hídrica, hidroperíodo y valores físico-químicos del agua. En segundo lugar, una matriz en la cual la unidad de muestreo fue el cucharonazo positivo (escala de microhábitat), conformada por 1.789 casos, estando las variables de especie representadas por el número de larvas de cada especie colectadas por cucharonazo y las variables ambientales constituidas por los elementos de vegetación (familia ó género) y exposición a la luz solar (luz-sombra) registrados *in situ* en cada cucharonazo.

RESULTADOS

Abundancia de anofelinos por tipo de hábitat

En el lapso comprendido entre septiembre 2002 y diciembre 2003, se muestrearon longitudinalmente cada mes; dos lagunas de sabana, tres herbazales, cuatro lagunas de bosque, dos caños o quebradas, un río y un pantano, los cuales suman trece hábitats y 178 muestreos de 30 cucharonazos cada uno, para un total de 5.340 cucharonazos. Dos lagunas, un herbazal y el río, se secaron completamente durante enero y febrero, los meses de sequía más intensa. Las muestras estuvieron constituidas de la siguiente manera: lagunas de sabana 1.080 cucharonazos, lagunas de bosque 1.410, caños 1.290, herbazal 690, río 480, y pantano 390,

capturándose 8.073 larvas de anofelinos de todos los estadios en estos hábitats. Los valores de las variables físico-químicas de pH, conductividad, temperatura y SDT, así como dinámica hídrica y color aparente del agua observados en los hábitats están resumidos en la Tabla I.

En la Tabla II se resume la cantidad de larvas colectadas por especie de anofelino y tipo de hábitat durante todo el estudio, distribuidas en 10 especies del género *Anopheles* y una del género *Chagasia* Cruz. De las especies de *Anopheles* identificadas, siete pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus*,

siendo la más abundante *An. triannulatus s.l.* (51,9%), seguida de *An. albitarsis s.l.* (22,1%), *An. braziliensis* (Chagas) (7,1%), *An. darlingi* (4,5%), *An. nuneztovari* Gabaldon *s.l.* (1,6%), *An. oswaldoi s.l.* (Peryassu) (1,2%) y *An. strodei* Root *s.l.* (0,3%), en ese orden. *Anopheles triannulatus s.l.*, además de ser la especie más abundante, también fue la más ubicua, estando presente de manera importante en todos los tipos de hábitats (Tabla II). *Anopheles braziliensis*, *An. albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari s.l.* y *An. strodei s.l.* muestran una clara preferencia por los hábitats de agua estancada, mientras que *An. darlingi* fue colectado indistintamente en hábitats estancados

Tabla I. Valores promedio de las variables físico-químicas y características dominantes de dinámica hídrica y color aparente del agua observadas en los hábitats

Tipo de hábitat	Temp.	Cond.	pH	SDT	Dinámica	Color
Laguna de bosque	29,3	46,4	5,9	27,1	estancada	ámbar
Laguna de sabana	31,3	39,5	6,5	20,2	estancada	ámbar
Herbazal	29,5	57,4	5,9	31,4	estancada	ámbar
Pantano	22,5	11,3	4,3	5,6	estancada	ámbar
Caño	26,5	19,9	4,9	8,1	lenta	cristalina
Rio	29,5	81,0	6,0	40,4	lenta	ámbar

Temp. = temperatura del agua (°C), Cond. = conductividad (µS/cm), SDT = sólidos disueltos totales (mg/L).

Tabla II. Número total de larvas identificadas por tipo de hábitat para cada especie de anofelino

Especie	Laguna de bosque	Laguna de sabana	Herbazal	Pantano	Caño	Río	Total
<i>An. triannulatus s.l.</i>	1.985	1.311	117	148	59	572	4.192
<i>An. braziliensis</i>	0	227	348	0	0	0	575
<i>An. albitarsis s.l.</i>	598	749	432	2	0	1	1.782
<i>An. darlingi</i>	237	0	0	1	23	101	362
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	126	0	0	0	0	2	128
<i>An. strodei</i>	23	0	0	0	0	0	23
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	50	0	0	3	44	0	97
<i>An. squamifemur</i>	0	0	0	0	15	0	15
<i>An. (Anopheles) sp.</i>	0	0	0	9	10	0	19
<i>An. (Stethomyia) sp.</i>	4	0	0	0	36	0	40
<i>Ch. bonneae</i>	2	0	0	0	140	0	142
No identificados	351	141	56	46	44	60	698
Total	3.376	2.428	953	209	371	736	8.073

o con corriente. También se colectaron larvas de *An. (Lophopodomyia) squamifemur* Antunes (0,2%) y especies no identificadas de los subgéneros *Anopheles* (0,2%) y *Stethomyia* (0,5%), y una del género *Chagasia* (1,8%) posteriormente identificada como *Ch. bonneae* Root. Estas últimas especies y *Ch. bonneae*, se colectaron con mayor frecuencia en los hábitats con corriente tipo caño y río (Tabla II).

En las lagunas de sabana se colectaron solo tres especies de anofelinos, siendo los hábitats con menor diversidad de especies junto con el herbazal (Tabla II). No obstante, en estos hábitats se colectaron 2.428 (30,1%) larvas de todas las especies, siendo el segundo en este renglón después de las lagunas de bosque. La especie más abundante en las lagunas de sabana fue *An. triannulatus s.l.* con 1.311 (54,%) larvas colectadas, seguida por *An. albitarsis s.l.* con 749 (30,8%) y *An. braziliensis* 227 (9,3%) (Tabla II). En las lagunas de bosque, el hecho de poseer áreas soleadas y sombreadas las convierte en los hábitats con mayor diversidad junto con los caños, y uno de los de mayor abundancia. En las lagunas de bosque se colectaron 3.376 (41,8%) larvas distribuidas en ocho especies de anofelino, siendo la más abundante *An. triannulatus s.l.* con 1.985 (58,8%) larvas, seguida de *An. albitarsis s.l.* (17,7%), *An. darlingi* (7,0%), *An. nuneztovari s.l.* (3,7%), *An. oswaldoi s.l.* (1,5%) y *An. strodei* (0,7%), además cuatro larvas del subgénero *Stethomyia* y dos de *Ch. bonneae* (Tabla II). En los herbazales, hábitats de baja diversidad de especies y abundancia intermedia, se colectaron 953 larvas de tres especies de anofelinos, siendo la más abundante *An. albitarsis s.l.* con 432 (45,3%) larvas colectadas, seguida de *An. braziliensis* 348 (36,5%) y *An. triannulatus s.l.* 117 (12,3%) (Tabla II).

En el río, las charcas formadas durante la época seca y los cúmulos de vegetación flotante durante la época de lluvias, constituyen excelentes hábitats para *An. triannulatus s.l.* y son el principal hábitat de *An. darlingi* en la región, eventualmente se pueden colectar larvas de *An. albitarsis s.l.* y *An. nuneztovari s.l.* En los caños, pese a que ocuparon el segundo lugar en diversidad, las especies del subgénero *Nyssorhynchus* son escasas, solo se colectaron 59 (15,9%) larvas de *An. triannulatus s.l.*, 44 (11,9%) de *An. oswaldoi s.l.* y 23 (6,2%) de *An. darlingi*. La especie más abundante en los caños fue *Ch. bonneae* con 140 (37,7%) larvas colectadas, especie que es frecuentemente colectada en este tipo de hábitat junto con larvas de *An. squamifemur*

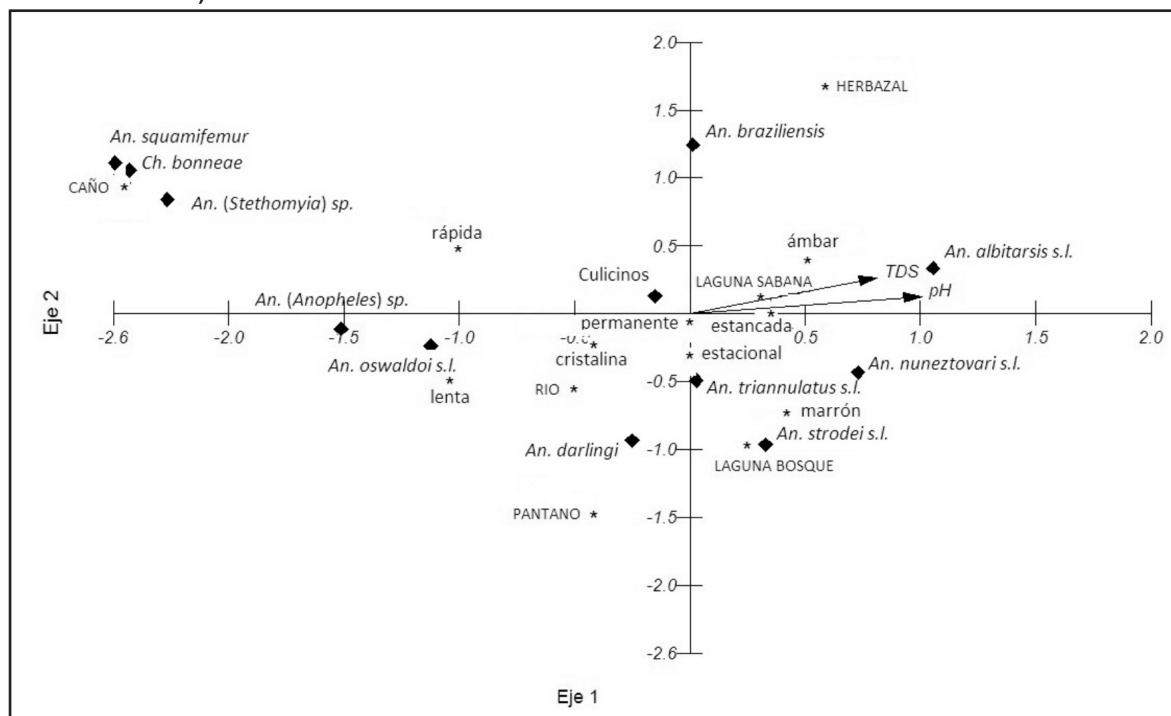
(4,0%), *An. (Stethomyia) sp.* (9,7%) y *An. (Anopheles) sp.* (2,7%) (Tabla II). Por último, los pantanos fueron los hábitats de más baja abundancia con 148 (70,8%) larvas de *An. triannulatus s.l.* colectadas junto con algunos especímenes del subgénero *Anopheles*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. albitarsis s.l.* y *An. darlingi* (Tabla II).

Distribución de las especies en el hábitat

Los autovalores en un Análisis de Correspondencia Canónica (CANOCO) miden la importancia de cada eje para explicar la varianza de la relación especies-ambiente. En el caso de la relación de las especies de anofelinos con el hábitat (cuerpo de agua), los valores absolutos para el primer y segundo eje fueron 0,25 y 0,19 respectivamente, mientras que el porcentaje acumulado de la varianza para las especies fue de 10,6 y 18,6% en cada eje, lo cual significa que el análisis explica satisfactoriamente menos de 19% de la varianza en la matriz de especies. Si bien este valor puede parecer bajo, hay que tener en cuenta que usualmente los datos de especies contienen mucho ruido, por lo que un CANOCO puede ser muy informativo aún explicando solo un poco de la varianza (ter Braak & Smilauer, 1998). En el caso de la varianza acumulada, el CANOCO acumula en el segundo eje 60,3% de la varianza explicada de las especies con respecto a las variables ambientales a escala de hábitat. Asimismo, la correlación de las especies con los gradientes ambientales es bastante elevada en ambos ejes, siendo 0,70 para el primero y 0,75 para el segundo, lo que sugiere que ambos gradientes tienen influencia en los datos, no habiendo mucha diferencia entre ambos. No obstante, los altos valores de correlación no necesariamente significan que una gran cantidad de varianza en las especies es explicada por las variables ambientales, ya que la varianza es explicada por los autovalores referidos antes (ter Braak & Smilauer, 1998)

En el diagrama de ordenación del CANOCO a escala de hábitat, mostrado en la Fig. 1, las especies de anofelinos se encuentran distribuidas a lo largo de patrones dominados por la dinámica hídrica y el tipo de hábitat. Basados en el conocimiento previo de la ecología de las especies en la zona (Moreno, 2000; Moreno *et al.*, 2000; 2015), se sabe que las especies ubicadas al lado derecho del diagrama, son frecuentes en hábitats de aguas estancadas, mientras que las ubicadas en el lado izquierdo son especies que pueden

Fig. 1. Diagrama de ordenación de las especies de anofelinos (♦) con respecto a variables de hábitat: características fisicoquímicas, color aparente del agua (marrón, ámbar, cristalina); tipo de hábitat, hidropериodo (estacional, permanente) y dinámica hídrica (estancada, lenta, rápida). (TDS = sólidos disueltos totales).



ser encontradas en hábitats con corriente; por lo tanto, el eje horizontal del diagrama puede ser interpretado como un gradiente de dinámica hídrica del hábitat. De la misma forma, el eje vertical puede ser interpretado con un gradiente de tipo de hábitat, que va desde el hábitat tipo herbazal en la parte superior al hábitat tipo pantano en la parte inferior. De esta manera, en un gradiente destacan *An. albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. strodei s.l.*, *An. triannulatus s.l.*, y en menor grado, *An. darlingi* asociados a hábitats tipo laguna de sabana y laguna de bosque, de dinámica hídrica estancada y agua color ámbar a marrón, destacándose en este grupo la asociación positiva de *An. albitarsis s.l.* con las variables físico-químicas de pH y SDT. En el otro extremo del gradiente están ubicadas *An. oswaldoi s.l.* y las especies del subgénero *Anopheles* asociadas a hábitats de corriente lenta, mientras que *An. darlingi* ocupa una posición intermedia entre estos dos grupos, colocándose entre los hábitats tipo laguna de bosque, pantano y río. Partiendo de la idea de que la proximidad implica similitud, la Fig. 1 muestra que *Ch. bonneae*, *An. (Stethomyia) sp.* y *An. squamifemur* comparten el mismo hábitat, mostrando afinidad por el hábitat tipo caño, estando asociadas

en menor grado a aguas cristalinas de corriente lenta, mientras que por otro lado, *An. braziliensis* se muestra claramente asociada al hábitat tipo herbazal, siendo éste el hábitat tipo para la especie.

Distribución de las especies en el microhábitat

Los valores del CANOCO para las especies de anofelinos con respecto a las variables de vegetación hidrófila y luz solar, a escala de microhábitat (cucharonazo), muestran que la variación de los datos es explicada en dos ejes, con valores absolutos de 0,30 y 0,11 para el primer y segundo eje respectivamente, asimismo, el porcentaje acumulado de la varianza es solo de 6,5% en el segundo eje, lo cual limita bastante el poder explicativo del análisis para la variación en las especies. Sin embargo, al restringir por variables ambientales el análisis mejora notablemente, elevándose a 72,4% el porcentaje acumulado de la varianza de las especies de anofelinos con respecto a las variables de vegetación y luz. Los valores de correlación especie-ambiente fueron de 61 y 39% para el primero y segundo eje respectivamente, indicando una influencia dominante del primer eje sobre el segundo.

Tal como lo indican los valores de correlación, el diagrama de ordenación muestra un primer eje horizontal dominante a lo largo del cual claramente hay un gradiente de tipos de vegetación (géneros), mientras que en el eje vertical se insinúan levemente gradientes dominados por la luz solar y el color aparente del agua (Fig. 2). De esta forma, en el cuadrante inferior izquierdo del diagrama destaca el grupo de especies formados por *An. squamifemur*, *An. (Stethomyia) sp.*, *An. (Anopheles) sp.* y *Ch. bonneae*. Estas especies están asociadas a un microhábitat sombreado, de agua cristalina y sin vegetación, mientras que *An. oswaldoi s.l.* y *An. darlingi*, si bien se encuentran en un microhábitat influenciado por la sombra, su ambiente está dominado por la presencia de vegetación acuática tales como los géneros *Pistia*, *Salvinia* y *Mayaca*, además de detrito. En el otro extremo del gradiente están *An. albitarsis s.l.* y *An. braziliensis* en un microhábitat dominado por la luz solar, agua ámbar y plantas como las gramíneas, algas verdes filamentosas, *Utricularia sp.*, *Ludwigia sp.* y *Eleocharis sp.*, esta última muy cercana a *An. braziliensis*. En otro grupo se encuentran *An.*

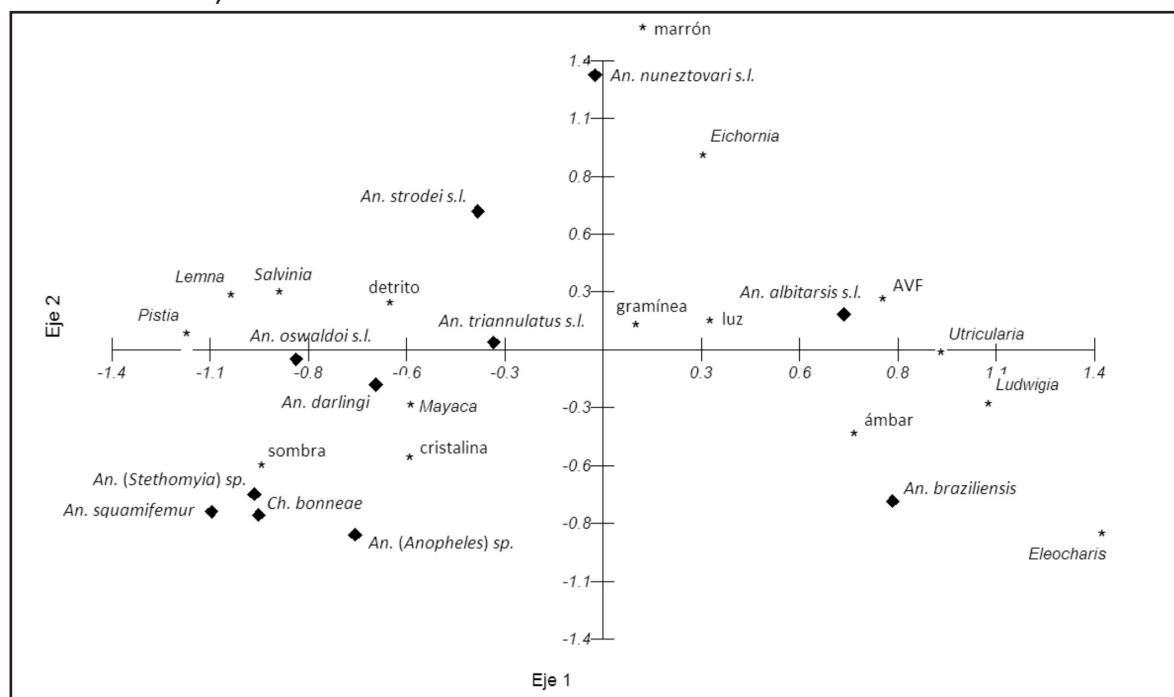
nuneztovari s.l. y *An. strodei s.l.*, la primera de ellas fuertemente asociada a hábitats de agua marrón con presencia de *Eichhornia crassipes*. Por último, *An. triannulatus s.l.*, dada su ubicación en el diagrama, tiende a ser una especie generalista en cuanto al color del agua, luz solar y presencia de vegetación acuática se refiere.

DISCUSIÓN

Distribución espacial de las larvas de anofelinos en el hábitat

En trece hábitats de seis tipos diferentes se colectaron 11 taxa de anofelinos, diez del género *Anopheles* más *Ch. bonneae*. De las especies de *Anopheles*, siete pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus*: *An. braziliensis*, *An. darlingi*, *An. albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. strodei s.l.* y *An. triannulatus s.l.*; una especie al subgénero *Lophopodomyia*, *An. squamifemur*; una especie al subgénero *Stethomyia* y una al subgénero *Anopheles*, estas dos últimas sin identificar.

Fig. 2. Diagrama de ordenación de las especies de anofelinos (♦) con respecto a variables de microhábitat: color aparente del agua (marrón, ámbar, cristalina); tipos de vegetación hidrofílica (tipos y géneros) y exposición a la luz solar (luz y sombra) presentes en el sitio de inmersión del cucharón. (AVF = alga verde filamentososa).



Esta lista difiere notablemente de la presentada anteriormente por Moreno *et al.* (2000), en cuanto al número e identidad de las especies, ya que no están presentes *An. punctimacula* Dyar & Sknab, *An. mediopunctatus* (Theobald), ni *An. neomaculipalpus* Curry, reportadas previamente en el municipio. Es muy posible que alguna de estas especies, o todas ellas, estén incluidas dentro del taxón identificado aquí como *An. (Anopheles)* sp. Tampoco están reportadas en este trabajo *An. eiseni* Coquillett ni *An. peryassui* Dyar & Knab, las cuales completan la lista de cinco especies del subgénero *Anopheles* reportadas por Moreno *et al.* (2000). En el caso de *An. mediopunctatus*, esta especie junto con *An. costai* y *An. forattinii* Wilkerson y Sallum, forman un grupo cuyos adultos hembras son indistinguibles entre sí (Wilkerson & Sallum, 1999); de estas tres, *An. costai* ha sido la única especie confirmada para el municipio por Moreno y Rubio-Palis (2003) a partir de especímenes identificados inicialmente como *An. mediopunctatus* (Moreno *et al.*, 2000). La ausencia de *An. eiseni*, *An. peryassui* y *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy, probablemente sea debida a que las hembras de estas especies oviponen en hábitats muy específicos ubicados fuera del rango de los incluidos en éste muestreo, tales como huecos de roca, huecos de árbol, manantiales y contenedores artificiales (Berti *et al.*, 1993; Forattini *et al.*, 1998; Rejmánková *et al.*, 1993). Por otro lado, el registro de nuevas especies del subgénero *Stethomyia*, podría contribuir al aumentar el número de especies de esta lista, y constituiría un gran aporte al conocimiento de la distribución geográfica de ese grupo, del cual se sabe muy poco. En conclusión, de lo señalado anteriormente, se deduce que el número de especies presentes en el área de estudio debe ser mayor al reportado en este trabajo.

En cuanto al subgénero *Nyssorhynchus*, *An. triannulatus s.l.* fue la especie más abundante, representando la cantidad de larvas de esta especie más de la mitad del total colectado. Asimismo, esta especie fue la de más amplia distribución, encontrándosele en todos los tipos de hábitats muestreados, siendo particularmente abundante en lagunas de bosque y lagunas de sabana, mientras que en los demás hábitats, si bien estuvo presente fue bastante escasa, confirmándose la distribución espacial de esta especie y su naturaleza ubicua en el municipio (Berti *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2000). Esta especie parece preferir las charcas y lagunas a

pleno sol, según los resultados reportados de otros lugares de Venezuela, donde se ha colectado *An. triannulatus s.l.* en altas densidades, siendo casi siempre la especie más abundante en el hábitat (Berti *et al.*, 1993; 2008; Rejmánková *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 1992; Rubio-Palis *et al.*, 2005; 2010). Estas características de la especie, en cuanto a tipo de hábitat y abundancia, parecen ser un rasgo común a lo largo de su distribución geográfica en Suramérica, pues León *et al.* (2003) y Vittor *et al.* (2009) en Perú y Brochero *et al.* (2006) en Colombia, también colectaron *An. triannulatus s.l.* en altas densidades en charcas y estanques piscícolas a pleno sol.

Anopheles albitarsis s.l. (= *An. marajoara*) fue la segunda especie más abundante y ampliamente distribuida, encontrándosele en cinco de los seis tipos de hábitats, coincidiendo los resultados también en este caso, con lo señalado anteriormente por Moreno *et al.* (2000) para el municipio. No obstante, esta especie parece tener preferencia por las lagunas de sabana, lagunas de bosque y herbazales, pues a diferencia de *An. triannulatus s.l.* fue bastante escasa en los demás hábitats. Resultados similares han sido reportados por Berti *et al.* (1993) en el estado Sucre y Rojas *et al.* (1992) en Barinas. Según Faran & Linthicum (1981) *An. albitarsis s.l.* (= *An. marajoara* = *An. allopha*) es una especie cuyas larvas son frecuentes y abundantes en charcas, orilla de los lagos y pequeños pozos, pero siempre en aguas estancadas y a pleno sol. Estos resultados, acerca de la distribución espacial de la especie, son particularmente importantes dado el papel vectorial de esta especie en el municipio y a que su principal hábitat en el área lo constituyen las lagunas y charcas generadas por la actividad minera (Moreno *et al.*, 2000; 2007; 2009; 2015).

Con respecto a las demás especies del subgénero *Nyssorhynchus*, destaca la preferencia de *An. braziliensis* por el hábitat tipo herbazal, siendo la especie dominante en este tipo de hábitat que comparte con *An. albitarsis s.l.* y *An. triannulatus s.l.*, aunque se le encuentra también de manera importante en las lagunas. Según Faran & Linthicum (1981) el hábitat típico de *An. braziliensis* está representado por pozos y charcas de aguas claras, pantanos y arrozales, siempre a pleno sol o parcialmente sombreados, nunca completamente a la sombra. De igual manera, los resultados indican que *An. oswaldoi s.l.* fue colectado con mayor frecuencia en los hábitats tipo laguna de bosque y caño, coincidiendo con el trabajo

anterior de Moreno *et al.* (2000), en cual esta especie fue más abundante en lagunas y quebradas, siendo éstos básicamente los mismos tipos de hábitats. También en el estado Bolívar, en la cuenca del río Caura, Rubio-Palis *et al.* (2010) reportaron que *An. oswaldoi s.l.* fue más abundante en los caños y pantanos, correspondiendo esta última denominación a un bosque inundado por desborde del río (cubeta de decantación), mientras que en el estado Amazonas Rubio-Palis *et al.* (2005) reportan que la especie prefiere los hábitats tipo pozo y caño. Sin embargo, Berti *et al.* (1993) refieren que *An. oswaldoi s.l.* fue más abundante en marismas salobres afectadas por las mareas en el estado Sucre, a pesar de que también se le colectó abundantemente en lagunas y arroyos. Siendo las marismas salobres un hábitat poco frecuente para esta especie, es posible que en ese reporte haya habido errores de identificación, puesto que existen otros estudios de la misma área que reportan que *An. oswaldoi s.l.* fue más abundante en pequeñas charcas, ciénagas y canales, pero siempre en agua dulce (Grillet, 2000)

En general, entre las diferencias señaladas por diversos autores, emerge un patrón en cuanto al hábitat preferido por *An. oswaldoi s.l.* El hábitat tipo de esta especie está conformado por depósitos de agua estancada tales como charcas, pozos y lagunas, suelos inundados y pequeñas corrientes de agua similares a caños y quebradas, pero siempre en el interior del bosque o al borde de este, siendo la sombra la condición indispensable para su presencia, tal como lo señalan Faran & Linthicum (1981). Un rango tan amplio en cuanto al nicho ocupado por la especie como el señalado anteriormente, pudiera estar indicando la presencia de más de una especie dentro del taxón en Venezuela, aspecto que ha sido señalado por Rubio-Palis (2005). Al respecto, se ha sugerido que *An. oswaldoi s.l.* es un complejo en el cual hay por lo menos tres especies isomórficas; *An. oswaldoi s.s.* restringida al interior de áreas boscosas, *An. konderi* que ocupa espacios abiertos en áreas recién modificadas (Flores-Mendoza *et al.*, 2004), y *An. oswaldoi B* (Ruíz *et al.*, 2005), recientemente reportada para la cuenca del bajo Caura, en el municipio Sucre del estado Bolívar en Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 2013).

Para el subgénero *Nyssorhynchus* también se reportan dos nuevas especies no registradas en la lista de Moreno *et al.* (2000), *An. strodei s.l.*, señalada para

el municipio por Berti *et al.* (1998) y *An. nuneztovari s.l.*, la cual constituye un registro para el municipio de gran importancia epidemiológica, reportada previamente por Moreno *et al.* (2004). Estas dos especies fueron colectadas casi exclusivamente en lagunas de bosque, habiendo sido ya ambas especies colectadas juntas en charcas temporales y permanentes en Venezuela en el estado Barinas (Rojas *et al.*, 1992). De igual manera, Parra-Henao y Alarcón (2008) reportaron desde Colombia haber colectado larvas de *An. nuneztovari s.l.* en charcas turbias poco soleadas, mientras que Brochero *et al.* (2006) la colectaron exclusivamente en estanques piscícolas. Al igual que ocurre con *An. oswaldoi s.l.*, la situación taxonómica de *An. nuneztovari s.l.* no está clara en Venezuela, ya que pudiera haber más de una especie dentro de este taxón en el país, teniendo en cuenta que *An. dunhami* Causey y *An. goeldii* (Rozeboom & Gabaldón) fácilmente pueden ser confundidas con *An. nuneztovari s.l.* (Calado *et al.*, 2008; Peyton, 1993), por lo que es necesario confirmar la identidad de las especies presentes en Venezuela

Es necesario resaltar la distribución espacial de *An. darlingi*, dada su gran importancia vectorial en el área de estudio (Moreno *et al.*, 2007; 2009). Tradicionalmente *An. darlingi* ha sido descrita como una especie riberña, cuyos hábitats preferidos lo constituyen arroyos en el bosque, bosques inundados y pequeñas charcas a orillas de los grandes ríos, todos en áreas total o parcialmente sombreadas (Faran y Linthicum, 1981; Hudson, 1984; Rozendaal, 1990). Según Hiwat y Bretas (2011) las larvas de *An. darlingi* requieren de condiciones fisicoquímicas estables en los hábitats, las cuales no pueden conseguir en pequeños cuerpos de agua, por lo que esta especie prefiere hábitats grandes y profundos como lagunas, pantanos y grandes ríos. Sin embargo, han surgido evidencias de un cambio en el patrón de distribución de esta especie, derivado de las alteraciones ambientales ocasionadas por la actividad humana. En este sentido, Vittor *et al.* (2009), sugieren la preferencia de esta especie por las grandes charcas con abundantes macrofitas, asociadas a ambientes alterados dominados por vegetación secundaria y con presencia de humanos en Perú. En este estudio, los resultados fueron muy similares a los referidos por Vittor *et al.* (2009), siendo *An. darlingi* más abundante en lagunas de bosque grandes y pequeñas, sombreadas parcial o totalmente, con abundantes

macrofitas y detritos, ubicadas cerca de viviendas humanas. Este es un resultado coherente con el cambio de patrón señalado anteriormente, si bien los hábitats sombreados con corriente tipo río y caño, siguen manteniendo un lugar importante como sitios de reproducción característicos de este vector de malaria. Observaciones preliminares en el municipio Sifontes han permitido determinar como el aumento del caudal de los ríos, una vez estabilizados, permiten la acumulación de vegetación flotante en la superficie, particularmente *P. stratiotes* y *E. crassipes*, que proveen a esta especie hábitats muy productivos; de la misma manera, durante la sequía, el estancamiento de los ríos produce charcas cubiertas de vegetación que son excelentes hábitats para *An. darlingi* (Moreno *et al.*, 2000). En este municipio, *An. darlingi* previamente había sido asociado por Moreno *et al.* (2000) a hábitats residuales de la actividad minera tipo lagunas y charcas. Asimismo, la especie había sido colectada en charcas temporales y efímeras muy pequeñas ubicadas en áreas parcialmente deforestadas en el borde del bosque y en la orilla de los ríos en época de sequía, resultados similares a los reportados por Rubio-Palis *et al.* (2005) para el Alto Orinoco en el estado Amazonas. La ubicación de los hábitats de *An. darlingi* en áreas de transición entre el bosque y espacios deforestados también ha sido previamente descrita por Singer & Castro (2001), debido a que el bosque primario raramente provee las condiciones necesarias por la ausencia de áreas parcialmente sombreadas y la acidez del agua (Hiwatt & Bretas 2011), mientras que Barros *et al.* (2011) en Brasil, propusieron el modelo de borde, *forest fringes*, para explicar esta distribución y su relación con la presencia de viviendas humanas. De hecho, muchas de las lagunas de bosque descritas en este trabajo, en las cuales *An. darlingi* fue más abundante, por su ubicación se corresponden con el modelo de borde. Asimismo, Berti *et al.* (2008) en un estudio realizado en la misma zona, reportan que *An. darlingi*, si bien fue más abundante en quebradas, también se le colectó con mucha frecuencia en lagunas con sombra, siendo muy posible que este tipo de hábitat, al cual se refieren Berti *et al.* (2008), sean los mismos hábitats referidos aquí como lagunas de bosque. Este tipo de hábitat también es referido por Rejmánková *et al.* (1999) y Rubio-Palis *et al.* (2005) quienes colectaron esta especie con mayor frecuencia y abundancia en lagunas con micrófitas en el estado Amazonas, Venezuela.

En cuanto a otras especies de anofelinos colectadas, se confirman los resultados reportados por Moreno *et al.* (2000) con respecto a la distribución y abundancia de las larvas de *An. squamifemur*, *Chagasia* sp. y las del subgénero *Stethomyia*, manteniéndose los hábitats tipo caño como los hábitats preferidos por estas especies y la naturaleza simpátrica de su distribución. Con respecto al género *Chagasia*, no estaba clara la identidad taxonómica de la especie de este género presente en el área de estudio, debido a que anteriormente había sido identificada por Moreno *et al.* (2000) como *Ch. bathana* (Dyar), pero recientemente Berti *et al.* (2011) reportaron la presencia de *Ch. bonneae* Root, y *Ch. ablusa* Harbach, por primera vez en Venezuela, colectadas en el municipio Gran Sabana vecino al área de estudio. Esto puso en duda la existencia de *Ch. bathana* en Venezuela y obligó a revisar la identidad de la especie identificada como tal en el municipio Sifontes, identificándose algunos especímenes como *Ch. bonneae*, con lo que quedó confirmada la presencia de esta especie en el municipio, por lo tanto el taxón queda identificado aquí como *Ch. bonneae*, lo cual constituye un nuevo registro para el municipio. Igualmente las especies del subgénero *Anopheles*, son más frecuentes en los caños y pantanos, mientras que la descripción del caño como hábitat tipo para el subgénero *Stethomyia*, constituye un aporte relevante y que coincide con lo reportado por Rubio-Palis *et al.* (2010), quienes señalan los arroyos y manantiales en la región del río Caura en el estado Bolívar, como los hábitats preferidos por este subgénero.

Caracterización de los hábitats larvarios de las especies de anofelinos

Los resultados discutidos anteriormente en cuanto a la distribución espacial de las especies de anofelinos por tipo de hábitat, son confirmados por el Análisis CANOCO, el cual examina las relaciones de las especies individuales con las variables ambientales del hábitat. En este sentido, ha sido propuesto que la distribución espacial y temporal de los hábitats de larvas de anofelinos están definidos por la dinámica hidrológica, la luz y la vegetación acuática, ya que los hábitats ricos en vegetación proveen alimento y refugio contra depredadores (Grillet *et al.*, 2002; Rejmánková *et al.*, 1999; 2000). Por tal razón, este trabajo se enfocó en el análisis de las relaciones de las especies de anofelinos con las variables del hábitat y el microhábitat, analizándose por un lado

las relaciones de las especies con la dinámica hídrica del agua e hidroperíodo, y por el otro las relaciones con la vegetación acuática y la presencia de luz en el hábitat.

Con relación a la dinámica hídrica y características del agua en el micro-hábitat, es decir el sitio donde se colectó el espécimen, el análisis permitió establecer grupos de especies *a priori*. En primer lugar, especies que preferiblemente se crían en aguas estancadas y que difícilmente pueden ser encontradas en aguas con corriente como *An. braziliensis*, *An. albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari s.l.* y *An. triannulatus s.l.*, (Moreno *et al.*, 2000; Rozendaal, 1990), versus especies que solo pueden ser colectadas en agua corriente, como las especies del subgénero *Stethomyia*, *Ch. bonnae* y *An. squamifemur*. Otro grupo de especies están ubicadas a lo largo del gradiente y pueden ser colectadas en ambos tipos de dinámica hídrica, tanto en aguas estancadas como en quebradas y ríos, pero en lugares protegidos de la corriente por troncos, detritos y plantas flotantes como las del subgénero *Anopheles*, *An. darlingi* y *An. oswaldoi s.l.* (Charlwood, 1996; Moreno *et al.*, 2000; Rozendaal, 1990). De forma similar, Sinka *et al.* (2010), clasifican las especies de anofelinos en estas dos categorías, coincidiendo con este trabajo en la distribución para *An. darlingi*, pero no para *An. albitarsis s.l.* (= *An. marajoara*) ni *An. nuneztovari s.l.*, especies que estos autores tipifican en hábitats con corriente, en los cuales si bien pueden ser colectadas ocasionalmente, no constituyen sus hábitats típicos. Es importante agregar que *An. albitarsis s.l.* es un complejo de al menos nueve especies, de las cuales solo cinco han sido descritas formalmente, por lo que hasta el presente no se conoce con certeza la bionomía y ecología de cada una de las especies que conforman el complejo (Ruiz-López *et al.*, 2012).

Otra variable importante que resalta del análisis es el color aparente del agua, según Stein *et al.* (2011) además del tamaño y la vegetación, el color aparente del agua en el hábitat es una de las características que más contribuye a la variabilidad en las especies, siendo esta una variable subvalorada y poco estudiada. Con respecto a esta característica el análisis permitió establecer tres grandes grupos *a priori*: las especies que se encuentran en aguas de color ámbar, que son la mayoría, las especies de agua marrón, y las especies de aguas cristalinas como las del subgénero *Stethomyia* y otras especies

raras. En este aspecto, Sinka *et al.* (2010) colocan todas las especies de vectores en hábitats de agua clara, aunque algunas especies, como *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.* y *An. nuneztovari s.l.*, pueden ser colectadas con mucha frecuencia en hábitats de aguas muy marrón, con un alto contenido de materiales en suspensión, lo cual ha sido reportado con frecuencia para esta última especie (da Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002; Nagm *et al.*, 2007). Destaca en este trabajo, la asociación positiva de *An. albitarsis s.l.* con las variables fisicoquímicas de pH y SDT, esta última característica de hábitats con aguas muy turbias.

En cuanto a la presencia de luz solar y vegetación, la productividad de un hábitat depende, además de las condiciones físico-químicas adecuadas, de una buena proporción de luz y sombra (Hiwat & Bretas, 2011). La mayoría de las especies de mosquitos requieren de condiciones específicas, variables de una especie a otra en cuanto a la demanda de luz y de sombra. En este sentido, Sinka *et al.* (2010), clasifican las especies de vectores como heliofilicas y heliofóbicas, según el grado de exposición solar en que se encuentren, colocando a *An. darlingi* como heliofóbica, *An. marajoara* como heliofilica y *An. nuneztovari s.l.* en ambas categorías. En el caso de *An. darlingi*, se sabe que prefiere los hábitats parcialmente sombreados ubicados en el borde del bosque y áreas recientemente deforestadas donde penetra la luz solar (Barros *et al.*, 2011; Charlwood, 1996; Hiwat & Bretas, 2011; Rozendaal, 1990). Este es un hábitat que es compartido por otras especies tales como *An. oswaldoi s.l.*, eventualmente *An. nuneztovari s.l.* y *An. triannulatus s.l.*, aunque el hábitat de estas dos últimas especies se desplazan más hacia ambientes completamente soleados, mientras que *An. oswaldoi s.l.* prefiere ambientes completamente sombreados (Brochero *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2000; Rejmánková *et al.*, 1999; Rozendaal, 1990). Hay un segundo grupo de especies claramente heliofilicas asociadas a espacios abiertos expuestos a la luz y con abundante vegetación macrofitas, entre las cuales destacan *An. triannulatus s.l.*, *An. albitarsis s.l.* y *An. braziliensis*. Estas son justamente las especies más abundantes, debido a que los ambientes soleados son ricos en vegetación, más heterogéneos y ofrecen cobertura para los invertebrados, así como sustrato para el crecimiento de algas que sirven de alimento y propician la abundancia de larvas de anofelinos y otros invertebrados acuáticos (Grillet *et al.*, 2002). Un último grupo de especies, entre las cuales están

la de los subgéneros *Anopheles* y *Stethomyia*, *Ch. bonneae* y *An. squamifemur*, prefieren los hábitats completamente sombreados y carentes de vegetación hidrófila (Rejmánková *et al.*, 1999).

En general el análisis permitió establecer hábitats tipo para grupos de especies más que para especies individuales, con base en criterios de variables bióticas tales como la presencia o ausencia de vegetación acuática y variables abióticas como la dinámica hídrica y la presencia de luz solar. Estas se pueden resumir en tres grupos principales: especies cuyo hábitat tipo está constituido por hábitats estancados, a pleno sol y con abundante vegetación; especies de hábitats con corriente, a la sombra y sin vegetación; y especies de ambientes intermedios. Sin embargo, el análisis también permitió establecer algunas asociaciones individuales interesantes y muy consistentes, tales como la de *An. braziliensis* al hábitat tipo herbazal dominado por *Eleocharis*, la de *An. nuneztovari s.l.* al hábitat tipo charca de agua muy turbia, y la de las larvas de *Stethomyia* y *An. squamifemur* a los arroyos sombreados de aguas cristalinas.

Las asociaciones entre algunas especies de anofelinos y la vegetación acuática han sido ampliamente demostradas, así como la utilidad de la vegetación para predecir la presencia de determinada especie, lo cual también ha sido suficientemente explicado en el carácter estructural que confiere la vegetación al hábitat (Rejmánková *et al.*, 1992; 1993; 2000; Savage *et al.*, 1990). Un aporte novedoso de este estudio lo constituye la caracterización de hábitats carentes de vegetación, a la sombra y con una dinámica hídrica diferente, para especies consideradas raras, como las del subgénero *Stethomyia*, *Ch. bonneae* y *An. squamifemur*, de las cuales se sabe muy poco por lo que este resultado constituye un avance importante en su conocimiento. Otro aporte importante, por su aplicabilidad en el control, lo constituye la caracterización de los hábitats para especies vectoras como *An. darlingi* y *An. oswaldoi s.l.*, sobre las cuales hay mucha incertidumbre y evidencias firmes de adaptación a cambios antropogénicos (Moreno *et al.*, 2000; Vittor *et al.*, 2009). En este sentido, se confirma la preferencia de *An. darlingi* y *An. oswaldoi s.l.* por ambientes intermedios, parcialmente sombreados, de aguas de corriente lenta a estancada, con presencia de detrito y vegetación acuática de los géneros *Mayaca*, *Salvinia*, *Lemna* y *Pistia*.

Según Stein *et al.* (2011), la capacidad de relacionar las especies de anofelinos con cierto tipo de hábitat, de acuerdo a las características más importantes tales como el tipo, la exposición solar, la presencia o no de vegetación, la dinámica hídrica y el color del agua, es de gran importancia debido a su valor predictivo, ya que estas características pueden ayudar a revelar la presencia de ciertas especies, siendo esto de gran importancia en el muestreo de anofelinos y en el control de vectores. En este caso, más allá de los resultados obtenidos, puede considerarse que el principal aporte de este trabajo lo constituye el intento de caracterizar y describir los hábitats de anofelinos a nivel de microhábitat, lo que constituye un avance importante en la comprensión de la ecología de las especies y los factores que modulan su distribución espacial en Venezuela.

Conflicto de Intereses

Los autores declaramos que no se presentó ningún conflicto de intereses durante la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar por el apoyo logístico recibido a lo largo del proyecto. A Hernán Guzmán, por la identificación de las larvas de *Ch. bonneae*. Asimismo, a las comunidades del área de estudio por la receptividad mostrada durante la ejecución del trabajo. Este Proyecto fue financiado parcialmente por el Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón”, el FONACIT mediante el convenio N° 2002000410 y el Inter-American Institute for Global Change Research (IAI-CRN-048).

REFERENCIAS

- Barros F. S. M., Arruda M. E., Gurgel H. C. & Honorio N. A. (2011). Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: the importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. *Bull. Entomol. Res.* **6**: 643-658. doi: 10.1017/S0007485311000265.
- Belkin J. N., Hogue C. L., Galindo P., Aitken T. H. G., Schick R. X. & Powder W. A. (1965). Mosquito

- studies (Diptera Culicidae) II. Method for the collection, rearing and preservation of mosquitoes. *Contrib. Am. Ent. Inst.* **1**: 19-78.
- Berti J., Guzmán H., Liria J., González J., Estrada Y., Pérez E. (2011). Nuevos registros de mosquitos (Diptera Culicidae) para el estado Bolívar, Venezuela: Dos de ellos nuevos para el país. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 59-69.
- Berti J., Vanegas C., Amarista J., González J., Montañéz H., Castillo M., et al. (1998). Inventario Preliminar y observaciones biológicas sobre los anofelinos (Diptera: Culicidae) de una región minera del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Entomol. Venez.* **13**: 17-26.
- Berti J., Zimmerman R. & Amarista J. (1993). Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious area in Sucre state, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88**: 353-362.
- Berti-Moser J., González-Rivas J. & Navarro E. (2008). Fluctuaciones estacionales y temporales de la densidad larvaria de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) y familias de insectos asociados al hábitat en El Granzón, Parroquia San Isidro, Municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **48**: 177-189.
- Brochero H., Pareja P. X., Ortiz G. & Olano V. A. (2006). Sitios de cría y actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el municipio de Cimitarra, Santander, Colombia. *Biomédica.* **26**: 269-77.
- Calado D. C., Foster P. G., Bergo E. S., Dos Santos C. L. S., Galardo A. K. R. & Sallum M. A. M. (2008). Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**: 791-799.
- Charlwood J. D. (1996). Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 391-398.
- Da Silva-Vasconcelos A., Kato M. Y., Mourao E. N., de Souza R. T., Lacerda R. N., Sibajev A., et al. (2002). 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.* **97**: 151-161.
- Faran M. E. & Linthicum K. J. (1981). A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **13**: 1-81.
- Flores-Mendoza C., Peyton E. L., Wilkerson R. C. & de Oliveira R. L. (2004). *Anopheles (Nyssorhynchus) konderi* Galvão and Damasceno: Neotype designation and resurrection from synonymy with *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Peryassú) (Diptera: Culicidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **106**: 118-132.
- Forattini O. P., Kakitani I., Alvarenga M. M. G. R. & de Brito M. (1998). Formas imaturas de anofelinos em recipientes artificiais. *Rev. Saúde Pública.* **32**: 517-518.
- Grillet M. E. (2000). Factors associated with distribution of *Anopheles aquasalis* and *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae) in a malarious area, northeastern Venezuela. *J. Med. Entomol.* **37**: 231-238.
- Grillet M-E., El Souki M., Laguna F., León J. R. (2014). The periodicity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Venezuela. *Acta Tropica.* **129**: 52-60.
- Grillet M. E., Legendre P. & Borcard D. (2002). Community structure of neotropical wetland insects in Northern Venezuela. I. Temporal and environmental factors. *Arch. Hydrobiol.* **155**: 413-436.
- Hiwat H. & Bretas B. (2011). Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit. Vectors.* **4**: 177. doi: 10.1186/1756-3305-4-177.
- Hudson J. E. (1984). *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in the Suriname rain forest. *Bull. Ent. Res.* **74**: 129-142.
- León C. W., Valle T. J., Naupay O. R., Tineo V. E., Angel A. A. & Palomino S. M. (2003). Comportamiento estacional del *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*

- Root 1926 en localidades de Loreto y Madre de Dios, Perú 1999-2000. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*. **20**: 22-27.
- MPPS (2014). Dirección General de Salud Ambiental. Reporte Epidemiológico Semanal. Año 20 (Semana epidemiológica N° 52).
- Moreno J. E. (2000). Characterization of *Anopheles* breeding habitats in Sifontes, Bolívar state, Venezuela. [Abstract]. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* **16**: 295-312.
- Moreno J. E., Acevedo P., Martínez A., Sánchez V. & Petterson L. (2010). Evaluación de la persistencia de una formulación comercial de *Bacillus sphaericus* en criaderos naturales de anofelinos vectores de malaria en estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**: 109-117.
- Moreno J., Rubio-Palis Y. & Acevedo P. (2000). Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **40**: 21-30.
- Moreno J. E., Rubio-Palis Y., Páez E., Pérez E. & Sánchez V. (2007). Abundance, biting behavior and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas in southern Venezuela. *Med. & Vet. Entomol.* **21**: 339-349.
- Moreno J. E., Rubio-Palis Y., Páez E., Pérez E., Sánchez V. & Vaccari E. (2009). Malaria entomological inoculation rates in gold mining areas of southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**: 764-768.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Sánchez V. & Mariany D. (2004). Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldon, 1940 (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotropica.* **19**: 55-58.
- Moreno J. E., Rubio-Palis Y., Sánchez V. & Martínez A. (2015). Fluctuación poblacional y hábitat larval de anofelinos en el municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **55**: 52-68
- Moreno J. E. & Rubio-Palis Y. (2003). Primer reporte de *Anopheles (Anopheles) costai* y *A. forattinii* (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Entomotropica.* **18**: 211-213.
- Nagm L., Luitgards-Moura J. F., Neucamp C. D., Monteiro-de-Barros F. S., Alves H. N., Tsouris P., et al. (2007). Affinity and diversity indices for anopheline immature forms. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **49**: 309-316.
- Navarro C. J. C. (1996). Actualización taxonómica de la tribu Anophelini de Venezuela, con nueva clave para la identificación de larvas de 4to estadio. *Bol. Dir. Malariol. y San. Amb.* **35**: 25-43.
- Parra-Henao G. & Alarcón P. E. P. (2008). Observaciones sobre la bionomía de *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) en el municipio Valencia, departamento Córdoba, Colombia. *Bol. Mal. Salud Amb.* **48**: 95-98.
- Peyton E. L. (1993). *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami*, resurrected from synonymy with *Anopheles nuneztovari* and validated as senior synonymy of *Anopheles trinkae* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **25**: 151-156.
- Rejmánková E., Harbin-Ireland A. & Lege M. (2000). Bacterial abundance in larval habitats of four species of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Belize, Central America. *J. Vector Ecol.* **25**: 229-238.
- Rejmánková E., Roberts D. R., Harbach R. E., Pecor J., Peyton E. L., Manguin S., et al. (1993). Environmental and regional determinant of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) larval distribution in Belize, Central America. *Environ. Entomol.* **22**: 978-992.
- Rejmánková E., Rubio-Palis Y. & Villegas L. (1999). Larval habitats of anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J. Vector Ecol.* **24**: 130-137.
- Rejmánková E., Savage H. M., Rodríguez M. H., Roberts D. R. & Rejmanek M. (1992). Aquatic vegetation as basis for classification of *Anopheles albimanus* Weideman (Diptera: Culicidae) larval habitats. *Environ. Entomol.* **21**: 598-603.

- Rojas E., Brown E., Rosas C. & Scorza J. V. (1992). Populations of larvae of *Anopheles* spp. in natural breeding sites in Western Venezuela, an area of refractory malaria. *Rev. Saúde Pública*. **26**: 336-342.
- Rozendal J. A. (1990). Observation on the distribution of anopheline in Suriname with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **85**: 221-234.
- Rubio-Palis Y. (2005). Situación actual de la taxonomía de la Subfamilia Anophelinae (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 1-10.
- Rubio-Palis Y., Menares C., Quinto A., Magris M. & Amarista M. (2005). Caracterización de criaderos de anofelinos (Diptera: Culicidae) vectores de malaria del Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. *Entomotropica*. **20**: 29-38.
- Rubio-Palis Y., Moreno J.E., Bevilacqua M., Medina D., Martínez A., Cárdenas L., et al. (2010). Caracterización ecológica de los anofelinos y otros culícidos en territorio indígena del Bajo Caura, Estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**: 95-107.
- Rubio-Palis Y., Ruíz-López F., Guzmán H., Sánchez V., Moreno J. E., Estrada Y., et al. (2013). Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* B y *Anopheles (Nys.) albitarsis* F en la cuenca del río Caura, Estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Malarial. Sal. Amb.* **53**: 68-72.
- Ruíz F., Quiñones M., Calle D., Erazo H., Alzate J. & Linton Y. (2005). Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* from southern Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **100**: 155-160.
- Ruíz-Lopez F., Wilkerson R. C., Conn J. E., McKeon S. N., Levin D. M., Quiñones M. L., et al. (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors*. **5**: 44.
- Savage H. M., Rejmánková E., Arredondo-Jiménez J. I., Roberts D. R. & Rodríguez M. H. (1990). Limnological and botanical characterization of larval habitats for two primary larval vectors, *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis*, in coastal areas of Chiapas state, Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **6**: 612-620.
- Singer B. H. & Castro M. C. (2001). Agricultural colonization and malaria on the Amazon Frontier. *Ann. NY. Acad. Sci.* **954**: 184-222.
- Sinka M. E., Rubio-Palis Y., Manguin S., Patil A. P., Temperley W. H., Gething P. W., et al. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit. Vectors*. **3**: 72. doi: 10.1186/1756-3305-3-72.
- Stein M., Ludueña-Almeida F., Willener J. A. & Almiron W. R. (2011). Classification of immature mosquito species according to characteristics of the larval habitat in the subtropical province of Chaco, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **106**: 400-407.
- Ter Braak C. J. F & Smilauer P. (1998). *CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination (version 4)*. Micromputer Power (Ithaca, NY, USA). 332 pp.
- Vittor A. Y., Pan W., Gilman R. H., Tielsch J., Glass G., Shields T. et al. (2009). Linking deforestation to malaria in the amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**: 5-12.
- Wilkerson R. C. & Mureb Sallum M. A. (1999). *Anopheles (Anopheles) forattinii*: a new species in Series Arribalzagia (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **36**: 345-354.

Recibido el 12/08/2015
Aceptado el 25/11/2015

Taxonomía molecular de *Anopheles* del Ecuador mediante ADN mitocondrial (Citocromo c Oxidasa I) y optimización por Parsimonia Máxima

Molecular Taxonomy of Anopheles from Ecuador, using mitochondrial DNA (Cytochrome c Oxidase I) and Maximum Parsimony optimization

Gabriela Arregui^{1,2}, Sandra Enriquez¹, Washington Benítez-Ortiz¹ & Juan-Carlos Navarro^{1,3,4*}

RESUMEN

La identificación de especies de *Anopheles* es compleja debido a la presencia de varios complejos de especies o especies crípticas cuyos ejemplares son de difícil distinción morfológica. Se corroboró o se corrigió la identificación de especies de *Anopheles* spp. capturadas en Ecuador, utilizando 393 secuencias de ADN mitocondrial, Citocromo Oxidasa I (COI) de 36 especies de Anofelinos neotropicales depositadas en GenBank y mediante la construcción de árboles filogenéticos usando parsimonia máxima. Se analizaron las identificaciones moleculares de cinco especies de *Anopheles* mediante los criterios de monofilia y topología del árbol, secuencias provenientes de la localidad tipo y la divergencia genética intra/inter especies. Las topologías de los árboles resultantes corroboran la identificación de secuencias/especies de *Anopheles* (*Anopheles*) *pseudopunctipennis* Theobald, *An. (Ano.) eiseni* Coquillett y *An. (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann; se corrige la identificación molecular de *An. (Nys.) rangeli* Gabaldón, Cova-García y López (no *oswaldoi*) y permanece en duda la identificación correcta de las secuencias relacionadas el grupo *Punctimacula*, hasta tener disponibles un mayor número de secuencias COI de especies relacionadas. La matriz de ADN-COI de 241 secuencias/haplotiposx36 especies construida para estos análisis resultará de utilidad para la identificación molecular de especies de Anofelinos de Ecuador y del Neotrópico con base en la porción de 520 pb entre 2.272 a 2.792pb de COI.

Palabras clave: *Anopheles*, taxonomía molecular, Citocromo Oxidasa I, Ecuador.

SUMMARY

The *Anopheles* species identification is complicated by the presence of several complexes of species and species whose specimens are difficult morphological distinction. We use 393 mitochondrial DNA sequences, Cytochrome Oxidase I (COI) of 36 Neotropical species of Anophelinae deposited in GenBank and by constructing phylogenetic trees using maximum parsimony the objective was to corroborate or correct the molecular identification of five sequences/species of *Anopheles* collected in Ecuador and also available in Genbank. We identified the taxonomic units, based on monophyly, phylogenetic species definition, tree topology, occurrence of sequences from the type locality and genetic intra/inter divergence of clades. The topologies of the resulting trees corroborate the identification of sequences of *Anopheles* (*Anopheles*) *pseudopunctipennis* Theobald, *An. (Ano.) eiseni* Coquillett y *An. (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, while the molecular identification of *An. (Nys.) rangeli* Gabaldón, Cova-García y López (not "oswaldoi") is corrected and remains in doubt the correct identification of related sequences for sequences belonging to *Punctimacula* group, until have available a greater number of COI sequences from related species. However according to the criteria of type locality, these are not *punctimacula* in sensu stricto. Finally, the matrix of alignment DNA-COI haplotypes sequences of 241x36 species built for these analyzes will be useful for molecular identification of Anophelinae species from Ecuador and the Neotropics based on the portion of 520 bp COI (between 2,272- 2,792 bp).

Key words: *Anopheles*, molecular taxonomy, Cytochrome Oxidase I, Ecuador.

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es considerada como uno de los principales problemas de salud

pública en América y en zonas tropicales del mundo. En el reporte 2014 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 98 países presentan transmisión malárica, con 3.3 billones de personas en riesgo,

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador (UCE), Quito, Ecuador.

² Escuela Superior Politécnica del Ejército (ESPE). Carrera Ing. en Biotecnología, Quito, Ecuador.

³ Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Laboratorio de Biología de Vectores, Centro de Ecología y Evolución, Fac. Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁴ Proyecto Prometeo-Senescyt.

*Autor de correspondencia: juan.navarro@ciens.ucv.ve / jcnovac@gmail.com

de los cuales 1.2 billones en riesgo alto, mientras que en 2013, se estimó que 198 millones (124-283 millones) contrajeron la enfermedad con 584.000 fallecimientos (OMS, 2015). En Ecuador se registran miles de casos cada año, en 2011 se identificaron 1.232 casos para *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* (Orbe, 2012). Para el 2014, se reportaron 378 casos principalmente en la amazonía y en la Costa (Esmeraldas y Manabí), con un 57% de casos con debidos a *P. vivax* y 43 % para a *P. falciparum* (WMR, 2014). La incidencia del paludismo se relaciona con factores climáticos, geográficos y dificultades de orden económico o técnico (OMS, 2015) entre otras variables, la densidad poblacional de los mosquitos se eleva debido al incremento de los hábitats larvarios de origen antrópico (explotación minera y, petrolera que producen nuevos cuerpos de agua, ejem *An. darlingi* Root) y a la ausencia de un control efectivo del vector (Salazar *et al.*, 2006). Algunos autores han sugerido que algunas especies de *Anopheles* pueden transmitir parásitos de la malaria (*Plasmodium* spp.) en las zonas altas de Los Andes de América del Sur a causa del cambio climático, variación en el uso del suelo, construcción de nuevas carreteras, entre otros factores (Pinault & Hunter, 2012a).

En Ecuador la malaria es prevalente en la región costera y amazónica; sin embargo, registros históricos y actuales indican la presencia de vectores de la malaria en zonas altas de Ecuador. En los años 1940's se recolectaron larvas de *An. pseudopunctipennis* Theobald a lo largo de las vías del tren en construcción desde Guayaquil a Quito hasta una altitud de 3.200 m., siendo la especie más común y con mayor distribución altitudinal. En los valles de Imbabura y Pichincha también se registraron casos de malaria hasta una altitud de 2.500 m, sin embargo, nunca se ha reportado ningún caso en la ciudad de Quito a 2.800 m (Pinault & Hunter, 2012b). En el 2008, las provincias mayormente afectadas por malaria fueron: Esmeraldas, El Oro, Guayas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y, Manabí en la vertiente costera, y Orellana, Sucumbios y Morona Santiago en la vertiente amazónica; representando más del 85% del total de casos de paludismo en el país (Dávila & Bajaña, 2009).

El género *Anopheles* Meigen incluye la mayoría de las especies de la subfamilia Anophelinae con 444 especies descritas formalmente y alrededor de 40 identificadas como complejos de especies, que

esperan nombres formales (Harbach & Kitching, 2005; Harbach, 2007). El género *Anopheles* se subdivide en seis subgéneros: *Anopheles* s.s. Meigen (Cosmopolita), *Cellia* Theobald (Viejo Mundo), *Kerteszia* Theobald (Neotropical), *Lophopodomyia* Antunes (Neotropical), *Nyssorhynchus* Blanchard (Neotropical) y *Stethomyia* Theobald (Neotropical); sin embargo, Harbach *et al.* (2005), proponen un séptimo subgénero denominado *Baimaia* (*An. kyondawensis* Abraham) para una especie Oriental.

La identificación de especies de *Anopheles* es compleja debido a la presencia de varios complejos de especies o especies crípticas (González, *et al.*, 2010), cuyos ejemplares son de difícil distinción morfológica (Casas, 2004). La aplicación de la biología molecular mediante el uso de diversas secuencias de material genético y análisis filogenéticos han sido utilizadas para complementar, corroborar, y reconocer nuevas especies, estudiar complejos de especies y realizar cambios en la nomenclatura taxonómica, lo cual modifica las clasificaciones a medida que se incorpora nueva información morfológica y secuencias de ADN en GenBank (Bourke *et al.*, 2013; Pradeep *et al.*, 2013; Rozo-Lopez & Mengual, 2015; Ruiz-Lopez *et al.*, 2013; Wijit *et al.*, 2013 entre otros). Así, el estatus taxonómico y la sistemática de este género se encuentra aún sin resolver y en pleno desarrollo debido a problemas en la identificación de algunas especies, complejos de especies, especies crípticas y otros grupos de especies poco estudiadas taxonómicamente (Harbach, 2007; Loaiza *et al.*, 2013; Sallum *et al.*, 2002).

El género *Anopheles* se distribuye, en latinoamérica, principalmente en zonas de clima cálido y tropical de baja altitud (<500 m de altura). No obstante, se ha determinado la presencia de especies en tierras altas, principalmente del subgénero *Kerteszia* y de la Serie Arribalzagia del subgénero *Anopheles* (Pinault & Hunter, 2011; Rubio-Palis & Zimmermann, 1997; Sinka *et al.*, 2010; Zavortink, 1979). El subgénero *Kerteszia* se encuentran en zonas altas de América del Sur (Zavortink, 1979), ejemplo de éste grupo es *Anopheles neivai* Howard, Dyar & Knab, que ha sido registrada en tierras altas de Ecuador (Levi-Castillo, 1944, 1956; Sinka *et al.*, 2012; y datos no publicados de los autores). También se ha documentado una epidemia de malaria en tierras altas de Bolivia, registrando la introducción de *Plasmodium vivax* en una comunidad ubicada a

2.300 m de altura, cuya transmisión fue atribuida a *Anopheles pseudopunctipennis* (Rutar *et al.*, 2004).

Pinault & Hunter (2011, 2012a) realizaron diversas recolecciones de larvas *Anopheles* en las tres ecoregiones del Ecuador (con excepción de la llanura amazónica) con el reporte de cuatro especies: *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. punctimacula* Dyar & Knab y *Anopheles oswaldoi* (Peryassú). Sus hallazgos indicaron la presencia de vectores de la malaria en zonas bajas costeras del país y en localidades de piedemonte andino en la vertientes costa y amazónica (solo *An. oswaldoi*). Estos autores determinaron que las especies *An. albimanus*, *An. punctimacula*, y *An. oswaldoi* han invadido regiones andinas alcanzando altitudes máximas de 1.541 m, 1.906 m, y 1.230 m, respectivamente (Pinault & Hunter, 2011). Dichos hallazgos, son particularmente importantes debido a que se establece la presencia de vectores de la malaria en regiones superiores a los 1.200 m de altura, lugares donde no se efectúan los programas de erradicación del vector a cargo del Servicio Nacional de la Erradicación de la Malaria (SNEM) (Dávila & Bajaña, 2009).

La identificación de las larvas recolectadas por estos autores se basó en la utilización de claves morfológicas, y posterior corroboración molecular mediante la extracción y secuenciación del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa I (COI) realizando un alineamiento local mediante “Blast Search” en NCBI en GenBank, un método de búsqueda de identidad (similaridad simple) molecular aunque no filogenética.

Con base en las secuencias que se encuentran disponibles en GenBank, conociendo la incorporación de material de nuevas secuencias en esta base de datos de países cercanos/limitrofes al Ecuador, incluyendo nuevas especies descritas, y estando ante la presencia de especies isomórficas y complejos de especies como *albitarsis*, *oswaldoi*, *triannulatus*, Serie Arribalzagia, las cuales han sido reportadas por diferentes autores como: Brochero, *et al.* (2007); Conn *et al.* (2013); Dantur Juri *et al.* (2014); Estrada-Franco *et al.* (1993); Gómez *et al.* (2015); González *et al.*, (2010); Gutiérrez *et al.*, (2010); Lehr *et al.* (2005); Li & Wilkerson (2005); Loaiza *et al.* (2013); Moreno *et al.* (2013); Motoki *et al.* (2009); Orjuela *et al.* (2013); Quiñones *et al.*, (2001); Rosa-Freitas *et al.* (1998); Rueda *et al.* (2004); Ruiz *et al.* (2005); Ruiz-

López *et al.* (2010, 2012, 2013); Rubio-Palis *et al.* (2013); Sallum *et al.* (1999, 2008); Wilkerson *et al.* (2005); Wilkerson & Sallum (1999), nuestro objetivo fue corroborar el estatus o identidad taxonómica molecular de las secuencias de citocromo oxidasa I disponibles en GGenBank, correspondientes a las especies halladas en Ecuador, mediante inferencia filogenética con un método explícito y deductivo (Parsimonia Máxima) con un fin taxonómico alpha (identificación/taxonomía molecular) utilizando las secuencias de estas mismas especies y otros *Anopheles* de Suramérica y/o América Central, y al mismo tiempo construir una matriz alineada de secuencias de una porción del marcador COI ampliamente utilizado, que pueda ser utilizada para la identificación molecular de muestras del Ecuador y otras regiones de América del Sur.

Partimos aquí de la hipótesis, con base en la no verificación filogenética previa (Pinault & Hunter, 2011; 2012a) realizada solo por similaridad tipo “Blast Search” contra las secuencias de GenBank, que algunas secuencias pueden estar errónea o ambiguamente identificadas bajo la luz de las nuevas inclusiones de secuencias en GenBank y recientes cambios de nomenclatura en los grupos a los cuales pertenecen. Igualmente, una verificación filogenética puede resultar en la corroboración de otras secuencias en GenBank en la misma condición y rotulación errónea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las secuencias

Un total de 393 secuencias pertenecientes a 36 especies de la subfamilia Anophelinae (Culicidae) fueron utilizadas para la construcción de la matriz de alineamiento y análisis filogenéticos. Como grupo problema, se incluyeron las secuencias COI registradas de anofelinos colectados en Ecuador por Pinault & Hunter (2011, 2012a) en la sierra y costa: *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* (cinco secuencias), *Anopheles (Anopheles) punctimacula* (cinco secuencias), *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* (cinco secuencias), y *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (tres secuencias). Como grupo de especies para comparación y referencia desde GenBank fueron incluidas un total de 375 secuencias COI de anofelinos registrados para América del Centro y del Sur. Todas las secuencias de ADN correspondientes

al gen Citocromo c Oxidasa I (COI), fueron obtenidas de GenBank en formato Fasta cuyo códigos de acceso y origen se muestran en la Tabla I.

Las secuencias para comparación con el grupo interno o grupo problema de estudio fueron especies pertenecientes a los subgéneros *Anopheles* y *Nyssorhynchus*: *An. costai*, *An. eiseni*, *An. intermedius*, *An. malefactor*, *An. mattogrossensis*, *An. neomaculipalpus*, *An. peryassui*, *An. squamifemur* (secuencia de Ecuador), *An. albitarsis s.l.*, *An. benarrochi*, *An. braziliensis*, *An. darlingi*, *An. konderi*, *An. nuneztovari*, *An. rangeli* y *An. trinkae*, así como especies del subgénero *Kerteszia*: *An. bellator*, *An. pholidotus*, *An. cruzi* y *An. homunculus* y usando la secuencia del género *Chagasia* (secuencia de Ecuador) como raíz y grupo de referencia (outgroup) en el análisis. En la Tabla I se muestran los datos taxonómicos, origen y autores.

Alineamiento de secuencias

El alineamiento múltiple de las secuencias basado en la búsqueda de homologías posicionales fue realizado mediante ClustalW (Higgins *et al.*, 1996) implementado en MacVector (MacVector Inc.) con altas penalidades de creación y extensión de gaps (GOP y GEP) de 15,0 cada uno de forma de buscar un alineamiento por homología.

La matriz final de alineamiento fue analizada en el programa ALTER (ALignment Transformation EnviRonment) para el colapso de haplotipos y la obtención de la matriz en formato Nexus (Glez-Peña *et al.*, 2010) de 241 secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos. El modelo de sustitución de pares de bases al cual se ajusta la matriz fue determinado mediante ModelTest incluido en el software Paup 4.0a146 (Swofford, 2002, actualizado 2015), utilizando los criterios de información de Akaike (AIC), Akaike corregido (AICc) y por el índice Bayesiano (BIC).

La Fig. 1, muestra el esquema del genoma mitocondrial de Anophelinae, con la porción del Citocromo c Oxidasa I y las regiones más abundantes de secuencias disponibles en GenBank: la región alineada en este trabajo entre 2.272 y 2.992 pb y la región usada en código de barras o “barcoding” entre 1.514 y 2.173 pb.

Análisis filogenéticos

La matriz resultante con haplotipos colapsados (241 secuencias) fue analizada mediante el software TNT “Tree analysis using New Technology” (Goloboff *et al.*, 2000) para la obtención de topologías filogenéticas que permitan la identificación molecular por clados monofiléticos apoyados por el consenso de mayoría y por valores altos de bootstrap. La búsqueda de árboles filogenéticos se realizó bajo el criterio de optimización de Parsimonia Máxima, mediante búsquedas heurísticas. Los taxa fueron adicionados al azar con 1.000 réplicas de construcción por cada adición, bajo el algoritmo de recorte y reconexión de árboles (TBR - Tree Bisection Reconnection), guardando sólo los árboles óptimos obtenidos en cada réplica. Se realizó un consenso de mayoría de los árboles retenidos y luego se realizó un análisis de bootstrap con remuestreo de la matriz de 1.000 pseudoréplicas para apoyo de grupos o clados monofiléticos (Felsenstein, 1985). Posteriormente, se realizó un repesado de los caracteres homólogos mediante el índice de consistencia re-calculado, resultando un árbol único. Las secuencias de *Chagasia* y *Kerteszia* actuaron como grupos de referencia (grupo externo o “outgroup”) para el enraizamiento del análisis sensu Sallum *et al.* (2000). El número de caracteres informativos para parsimonia, no informativos y constantes, así como los índices de consistencia (IC), de retención (IR) fueron calculados mediante Paup 4.0a146 (Swofford, 2012) y los valores de sitios polimórficos, variables, composición de bases y la matriz de divergencia con distancia genética p-no corregida mediante MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

Las unidades taxonómicas han sido determinadas tomando en consideración los siguientes criterios: 1) concepto filogenético de especie, basado en un clado o linaje que comparte caracteres apomórficos (sinapomorfias) heredados de un ancestro inmediato común, con un patrón de ascendencia-descendencia e inferido mediante el criterio de optimización de Parsimonia Máxima o cladístico para la construcción de hipótesis filogenéticas congruentes con la clasificación taxonómica natural; 2) la ubicación de las secuencias en la topología, congruente con clados o subclados monofiléticos apoyados por un porcentaje mayor a 70% en consenso de mayoría y un valor estadístico de remuestreo de la matriz o bootstrap mayor a

Tabla I. Lista de especies/secuencias utilizadas en los análisis. Se muestran los números de acceso y autores (referencia) de dichas secuencias.

Género	Subgénero	Especie	Número de secuencias	Origen	Códigos de acceso	Autores
<i>Anopheles</i>		<i>costai</i>	2	Colombia	HM022403, HM022404	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
			2	Colombia	JX205127, JX205128	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
		<i>eiseni</i>	1	Brasil	AF417716	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
			1	Brasil	AF417718	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
		<i>intermedius</i>	1	Costa Rica	JX212805	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Linton, Y.M., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
			1	Panamá	JX212804	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Linton, Y.M., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
		<i>mattogrossensis</i>	1	Colombia	JX205126	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
			2	Colombia	JX205124- JX205125	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
		<i>neomaculipalpus</i>	1	Panamá	JX212801	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Linton, Y.M., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
			1	Colombia	HM022405	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
		<i>periyassui</i>	2	Colombia	HM022407- HM022408	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
			2	Colombia	KC354819- KC354820	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.L.
		<i>pseudopunctipennis</i>	5	Ecuador	JN412834- JN412838	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
			1	Nicaragua	AF417721	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.

...continúa en la pág. 134

...viene de la pág. 133

1	Colombia	KC354818	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.L.
2	Colombia	JX205122, JX205123	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
5	Ecuador	JN412839- JN412843	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
1	Nicaragua	AF417719	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
10	Panamá	JX212783- JX212792,	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Sanjur, O.I., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Linton, Y.M., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
4		JX212797- JX212800	
112	Colombia	FJ015158- FJ015269	Gutiérrez, L.A., Naranjo, N.J., Cienfuegos, A.V., Muskus, C.E., Luckhart, S., Conn, J.E. and Correa, M.M.
3	Colombia	KC354823- KC354825	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.L.
91	Costa Rica y Panamá	FJ516463- FJ516553	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Rovira, J. & Conn, J.E.
5	Ecuador	JN412826- JN412830	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
1	Nicaragua	AF417695	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
27	Panamá	HM030881- HM030907	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Sanjur, O.I., Wilkerson, R., Rovira, J., Gutiérrez, L.A., Correa, M.M., Grijalva, M.J., Birnberg, L., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
1	Argentina	DQ076204	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
1	Brasil	DQ076205	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
1	Paraguay	AF417696	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
1	Venezuela	DQ076234	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.

...continúa en la pág. 135

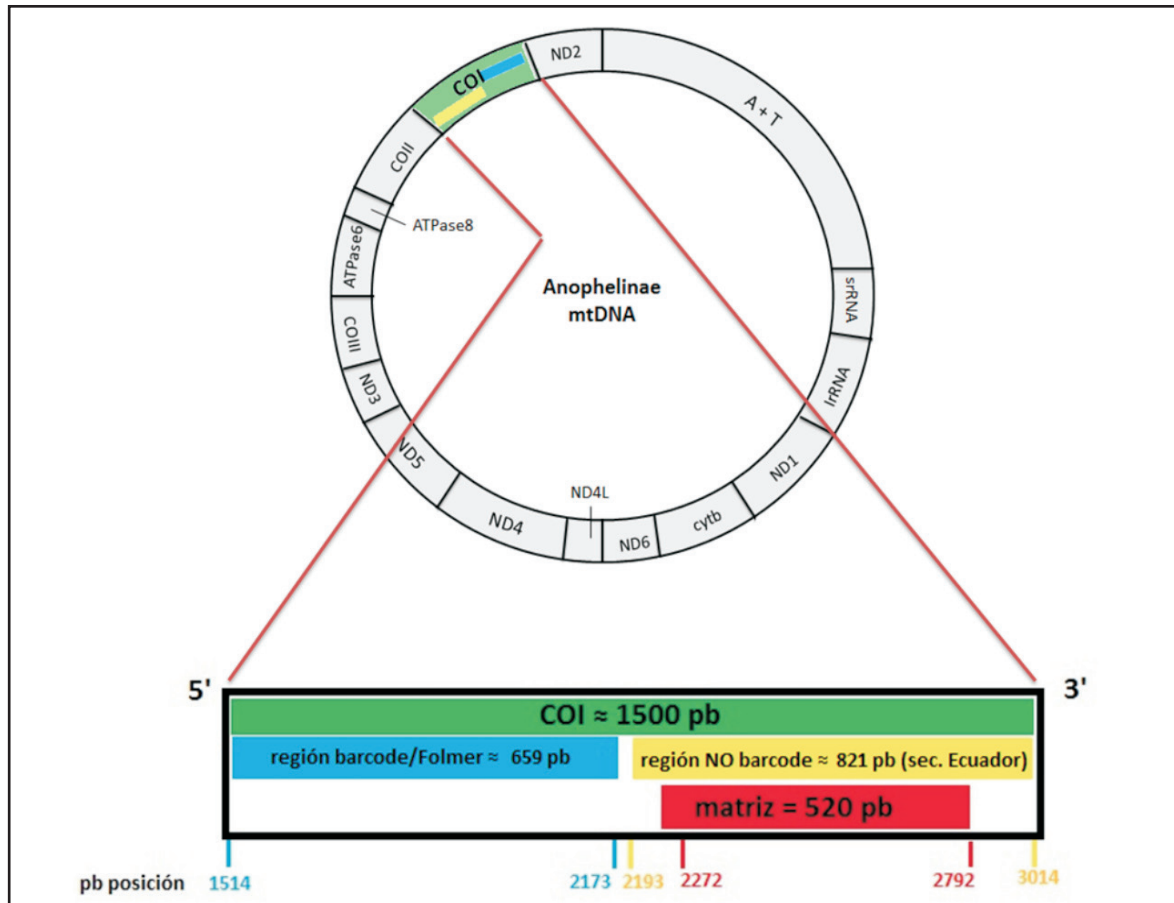
<i>albitarsis G</i>	2	Brasil	DQ076221, DQ076225	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>albitarsis H</i>	2	Brasil	DQ076222, DQ076223	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>albitarsis I</i>	2	Colombia	GQ153604, GQ153605	Gutierrez, L.A., Orrego, L.M., Gomez, G.F., Lopez, A., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M.
<i>aquasalis</i>	1	Colombia	KC354822	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.I.
<i>benarrochi B</i>	14	Colombia	JX205097- JX205110	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.I.
<i>braziliensis</i>	1	Colombia	HM022398	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.I.
<i>darlingi</i>	1	Brasil	AF270932	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>deaneorum</i>	2	Brasil	DQ076227, DQ076229	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>dunhami</i>	1	Brasil	AF270931	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>janconnae</i>	2	Brasil	DQ076232, DQ076233	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>sp.nr.konderi</i>	7	Brasil	DQ784827- DQ784831, DQ784843, DQ784844	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>konderi of Sallum</i>	8	Brasil	DQ784839- DQ784842 DQ784845- DQ784848	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.

...continúa en la pág. 136

...viene de la pág. 135

<i>marajoara</i>	3	Brasil	DQ076216, DQ076218, DQ076220	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>nuneztovari</i>	1	Brasil	AF417700	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
	20	Colombia	JN255752- JN255771	Jaramillo, L.M., Gutierrez, L.A., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M.
<i>oryzalimnetes</i>	2	Brasil	DQ076211, DQ076215	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>oswaldoi</i>	3	Ecuador	JN412831- JN412833	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
<i>oswaldoi s.s.</i>	7	Brasil	DQ784832- DQ784838	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>oswaldoi A</i>	3	Brasil	DQ784849- DQ784851	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>rangeli</i>	5	Colombia	HM022390- HM022394	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
	5	Colombia	JX205117- JX205121	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
<i>triannulatus</i>	2	Colombia	HM022387, HM022388	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
	1		JX852142	Rosero, D.A., Jaramillo, L.M., Gutierrez, L.A., Conn, J.E. & Correa, M.M.
	1		JX205111	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
<i>Kerteszia bellator</i>	1	Brasil	AF417704	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
<i>cruzii</i>	1	Brasil	AF417703	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
<i>Lophopodomys squamifemur</i>	1	Ecuador	AF417723	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
<i>bathana</i>	1	Ecuador	AF417726	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
Chagasia				
Total			393	

Fig. 1. Esquema del genoma mitocondrial de Anophelinae, y la porción del gen citocromo oxidasa I en color verde. En azul, la región barcode/Folmer correspondiente a las secuencias que no lograron ser emparejadas en el alineamiento, la franja amarilla representa la región COI no barcode a la que pertenecen las secuencias utilizadas y la franja roja pertenece a la sección de la matriz alineada (2.272-2.792 pb).



50%, y congruente con la divergencia intra e inter secuencias/especies calculada por la matriz de distancia p-no corregida; 3) ubicación en un clado apoyado con las secuencias/especies en sensu stricto (s.s.), consideradas aquellas secuencias topotípicas o provenientes de la localidad tipo (localidad del Holotipo y de la descripción original), en caso de estar disponible.

RESULTADOS

Topologías de árboles y agrupamientos de taxa

La matriz alineada resultante fue de 241 secuencias de 520 pares de bases (caracteres) de ADNmt-COI (241 x 520). Del total de caracteres (520), 179 fueron informativos para parsimonia

(sinapomorfias), 14 no informativos (autapomorfias) y 327 constantes (no variables), mientras 191 fueron polimórficos, con una composición de bases A+T= 69,9% y C+G= 30,1%. El índice de consistencia fue de IC=0,40; de retención IR=0,84 y el recalculado RCI=0,62. La matriz de secuencias alineadas se ajustó a los modelos K81uf+I+G según los criterios de Akaike (ACI) y Bayesiano (BIC), y al modelo HKY+I+G de acuerdo al criterio de Akaike corregido (AICc).

La Fig. 2 muestra la hipótesis filogenética general (consenso de mayoría con 100% en todos los clados). La ubicación de las secuencias identificadas por Pinault & Hunter *op. cit.* se muestran en rojo lateralmente al grupo o clado señalado y se indica con una barra vertical con su correspondencia

taxonómica. Un análisis de Neighbor joining comúnmente utilizado en “barcoding” fue realizado y cuya topología (no mostrada) resultó igual que el árbol consenso de parsimonia.

En este árbol resultante se muestran grupos o clados que se identifican de la siguiente forma: Clado A con el taxón externo y basal *Chagasia batana*, luego el grupo interno con un 100% en consenso de mayoría y de bootstrap, internamente sigue el clado B con dos subclados, que incluyen el subgénero *Kerteszia* como más externo (60% bootstrap) y un clado (75% bootstrap) con *An. costai* de la Serie Arribalzagia.

Luego, y hacia lo más interno o derivado del árbol se observa clado D con *An. neomaculipalpus* (100% bootstrap), el clado E con las especies del Complejo *punctimacula*: *An. malefactor* (E1), *An. punctimacula* ss. (E3) y el grupo de secuencias identificadas como “*punctimacula*” (E2) por Pinault & Hunter (*op. cit.*).

Internamente al clado E, se encuentra el clado interno FG, con los subclados F con secuencias de *An. intermedius* y *An. “punctimacula”* (no *punctimacula* de Colombia), y el subclado hermano G con 15 subclados: G1 y G2 con secuencias de *An. punctimacula* (no *punctimacula* de Colombia) y *An. braziliensis*. Los clados G3 y G4 con secuencias de *Oswaldoi* s.l. y G5 con secuencias de *An. rangeli* y *An. oswaldoi* (no *oswaldoi* de Ecuador).

En lo más interno del árbol, se ubicaron los subclados G6, G7, G8 y G9 y el subclado hermano con los grupos G10, G11, G12 y G13. En el primer grupo, en G6 se ubican respectivamente secuencias de *An. benarrochi* B (Ruiz *et al.*, 2005) y una secuencia de *An. rangeli* (no *rangeli* de Colombia), el grupo G7 corresponde a secuencias de *An. triannulatus* s.l., G8 con *An. darlingi* y G9 con una representación de las 11 secuencias de *An. albimanus* de América Central, incluyendo Panamá, de Colombia y Ecuador. En este caso particular (*An. albimanus*), con fines de una mejor observación gráfica se utilizaron en la figura mostrada solo 11 secuencias de *albimanus*, incluyendo las cinco de Ecuador de Pinault & Hunter (2011, 2012a). Todas estas secuencias se ubicaron en el mismo clado con un 92% de bootstrap.

En el subclado hermano, el grupo G10 se ubicaron las secuencias de *An. albitarsis* s.l.,

incluyendo *An. albitarsis* s.s. (Argentina), *albitarsis* G, *daenorum*, *albitarsis* H, *marajoara*, *albitarsis* I, F, *janconnae* y *oryzalimnetes*. En el grupo G12 *An. nuneztovari* y en el G13 las secuencias de *An. pseudopunctipennis*, incluidas las secuencias de Ecuador de Pinault & Hunter *op. cit.* Las Fig. 3, 4, 5 y 6 muestran en detalle tipo “zoom” los clados y subclados descritos para la Fig. 1.

La divergencia promedio total fue de 0,08 (8%). La divergencia intra-especies mostró un intervalo entre 0-3%, mientras que inter (entre) especies/clados fue de 6-8 a 14%, lo cual se corresponde por lo reportado por Gómez *et al.* (2015) para COI en la Serie Arribalzagia, por Bourke *et al.* (2013), Ruiz-López *et al.* (2012, 2013), y McKeon *et al.* (2010) para otros grupos de anofelinos. Entre especies de Complejos fue: 3-7% entre *albitarsis* s.l. y 3-5% entre *oswaldoi* s.l. con secuencias de diferentes países.

Anophelinae del Ecuador

La revisión y búsqueda de secuencias y el análisis histórico de literatura permitió actualizar la lista de las especies de Anophelinae señaladas para el Ecuador (Tabla II), con un total de dos géneros, *Anopheles* con 22 especies y *Chagasia* con tres especies. El género *Anopheles* está representado por los subgéneros *Anopheles* (8 especies), *Nyssorhynchus* (6 especies), *Kerteszia* (5 especies) y *Lophopodomyia* (2 especies) (Levi-Castillo 1944, 1945a,b, 1956; Escovar *et al.*, 2014; Linton *et al.*, 2013; WRBU web page). Dos especies fueron descritas con localidad tipo en este país: *An. gomezdelarorrei* Levi-Castillo (Chiltazón, Carchi) y *An. trinkae* Faran (Puyo, Pastaza).

DISCUSIÓN

El análisis enraizado con el género *Chagasia* Cruz [*Ch. batana* (Dyar)] muestra las dos especies del subgénero *Kerteszia* (*An. bellator* y *An. cruzii*) como grupos de referencia, ubicados en la parte basal del árbol y en monofilia recíproca sensu Sallum *et al.*, (2002) con un 100% y 75% de bootstrap, respectivamente, con respecto al grupo interno mostrando los primeros resultados concordantes con la taxonomía actual. El índice de consistencia mostró un 40% de caracteres homólogos y 60% de homoplasia, y la retención de sinapomorfias en el árbol fue de 84% lo que indica la fortaleza en

Fig. 2 Árbol filogenético de 241 secuencias de GenBank mostrando los clados correspondientes a la identificación molecular por medio de Parsimonia Máxima y ADNmt-COI de las secuencias de Anopheles de Ecuador. En negrilla y rojo se señala la ubicación y corrección taxonómica de las secuencias de Ecuador.

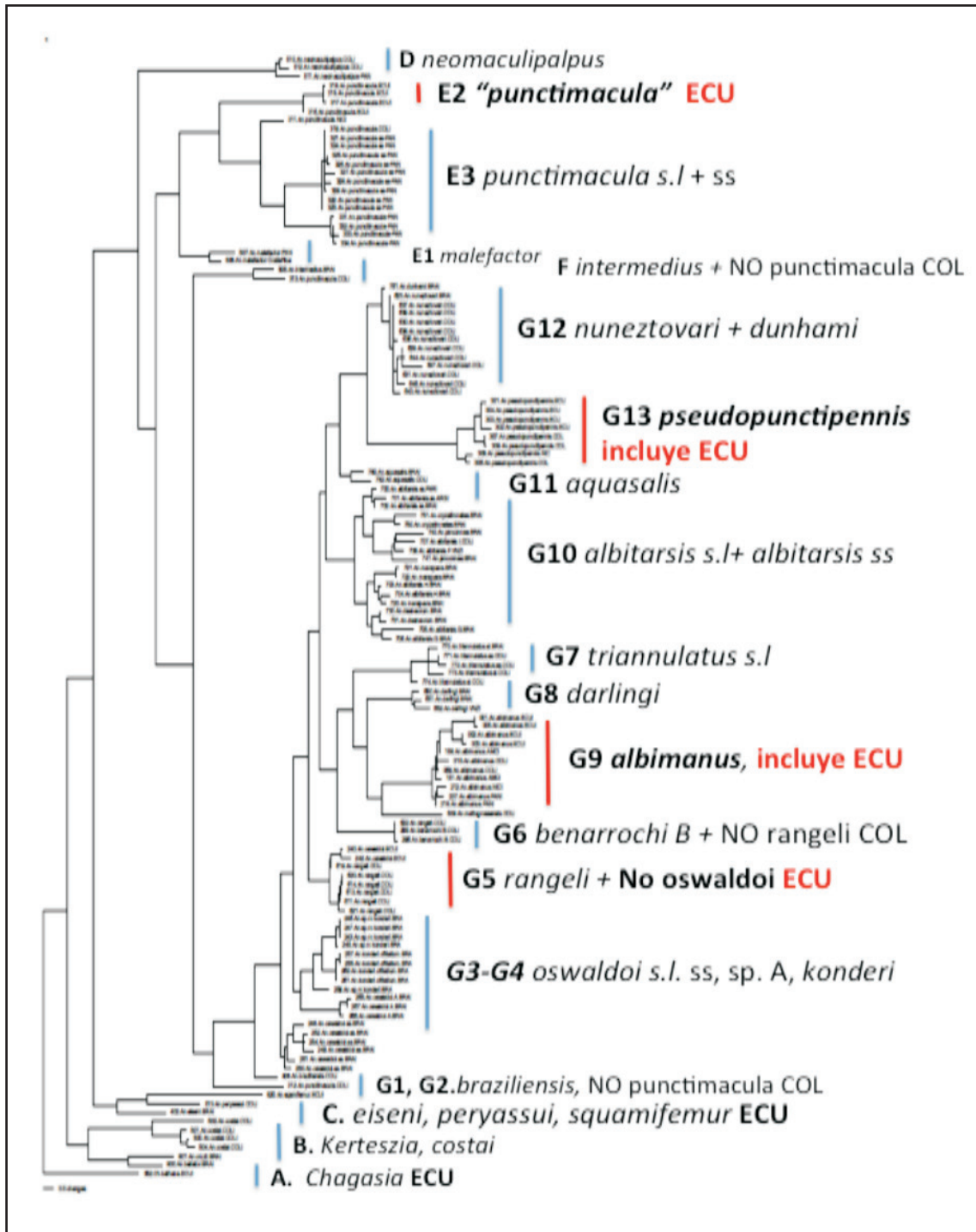


Tabla II. Lista actualizada de Anophelinae del Ecuador, basado en la literatura y secuencias en las secuencias disponibles en GenBank.

Género	Subgénero	Especie	
<i>Anopheles</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	<i>albimanus</i>	
		<i>apicimacula</i>	
		<i>aquasalis</i>	
		<i>oswaldoi sp B</i>	
		<i>nr konderi</i>	
		<i>rangeli</i>	
	<i>Kerteszia</i>	<i>bambusicolus</i>	
		<i>neivai</i>	
		<i>cruzii</i>	
		<i>boliviensis</i>	
		<i>lepidotus*</i>	
	<i>Anopheles</i>	<i>Anopheles</i>	<i>calderoni</i>
			<i>darlingi</i>
			<i>eiseni</i>
			<i>fluminensis</i>
			<i>gomezdelatorrei*</i>
			<i>mediopunctatus</i>
			<i>pseudopunctipennis</i>
			<i>punctimacula s.l.</i>
<i>squamifemur</i>			
<i>triannulatus</i>			
<i>trinkae*</i>			
<i>Chagasia</i>		<i>bathana</i>	
		<i>bonneae</i>	
		<i>fajardi</i>	

(*) Especies con localidad tipo en Ecuador

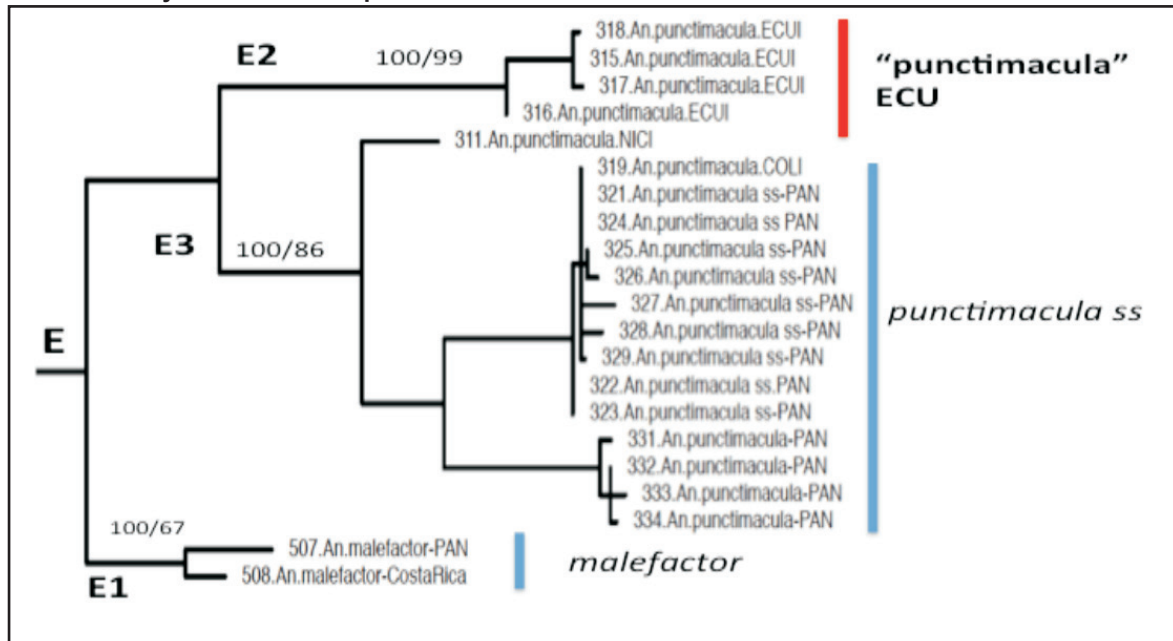
la estructura filogenética resultante, que sumada a los valores de remuestreo (bootstrap) y un 100% en todos los clados en el consenso de mayoría y el árbol repesado dan un fuerte apoyo a los clados formados como grupos monofiléticos.

De esta manera, aquellas secuencias/especies que se ubican en forma parafilética fuera del clado de las secuencias topotípicas son evidencia de secuencias provenientes de ejemplares erróneamente identificados y que ocurre en grupos pertenecientes a complejos de especies y de morfología de difícil identificación como es el caso del grupo *punctimacula* (Gómez *et al.*, 2015; y Loaiza *et al.*, 2013) coincidiendo con la hipótesis planteada.

En el grupo interno, los resultados obtenidos en los árboles muestran clados y subclados congruentes con la definición de especies filogenéticas y gran correspondencia con la nominación taxonómica con algunas excepciones en grupos de dificultad taxonómica o presencia de complejos de especies.

En la topología se muestran clados monofiléticos apoyados (con valores de bootstrap > 50% y de consenso de mayoría de 100%) con especies/secuencias que se corresponden con la denominación de la unidad taxonómica de especie. Las secuencias/especies de Ecuador producto de la publicación de Pinault & Hunter *op. cit.*, identificadas por alineamiento local mediante “Blast

Fig. 3 Detalle del Clado *punctimacula*. Ubicación de secuencias identificadas como *punctimacula* que corresponden a otra especie isomórfica (ver explicación en texto). Las muestras de Ecuador-*punctimacula* de Pinault & Hunter (2012), se ubican en el subclado no E2. Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.



Search” y depositadas en GenBank (*punctimacula*, *pseudopunctipennis*, *oswaldoi* y *albimanus*) muestran ambas situaciones: incongruencia y congruencia filogenética en su ubicación en la topología de los árboles obtenidos con las secuencias/especies topotípicas. De esta forma, las secuencias/especies de *An. punctimacula* y *An. oswaldoi* reportadas por Pinault & Hunter *op. cit.* se ubicaron en parafilia, respectivamente, con el clado topotípico para cada especie, demostrando su identificación incorrecta, mientras que las secuencias de *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus* quedaron incluidas en clados monofiléticos con las secuencias topotípicas para cada especie, confirmando una identificación correcta. Cada caso se explica a continuación:

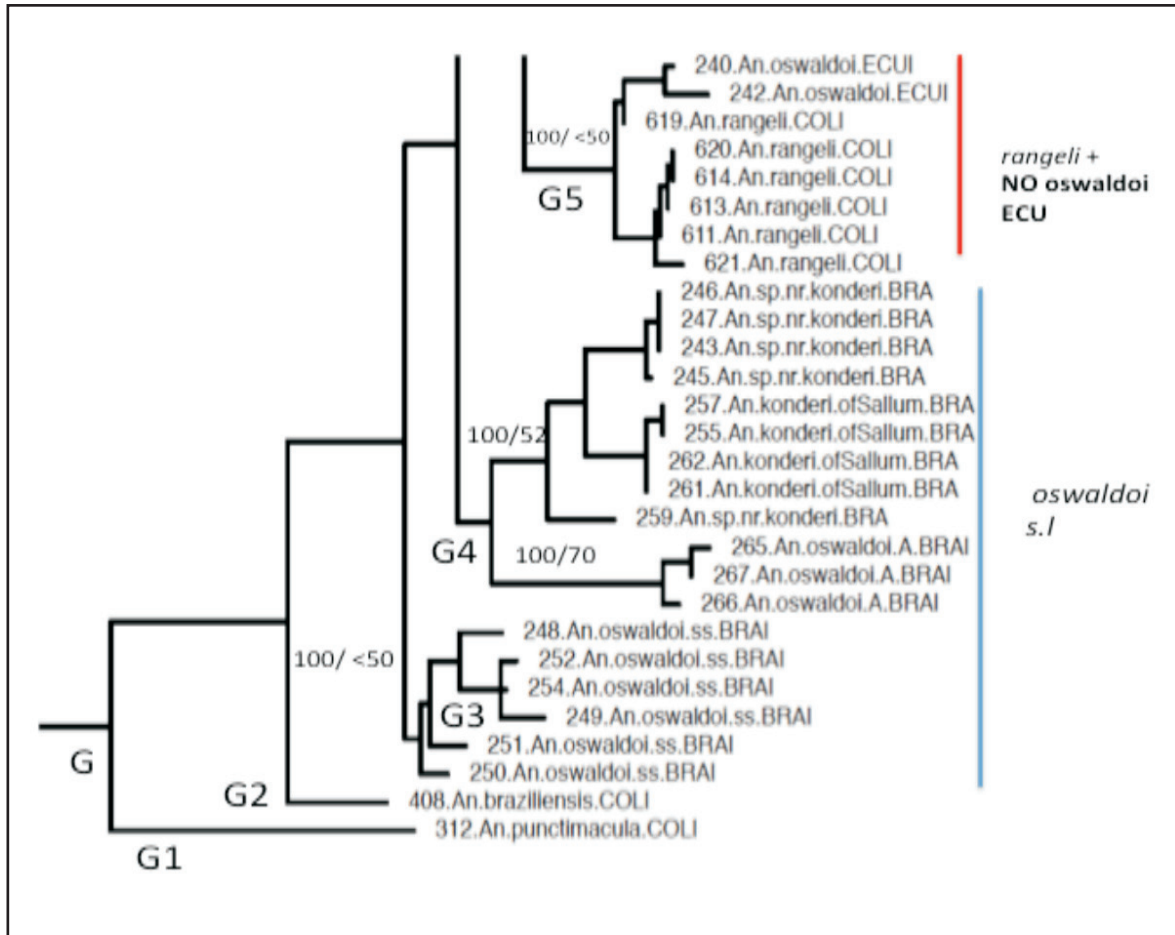
Serie Arribalzagia, Caso Anopheles punctimacula

Para esta especie es necesario observar los resultados obtenidos en los clados G (“*punctimacula*” de Colombia), E (secuencias de, Panamá, Ecuador, Nicaragua y Colombia, incluido *An. malefactor*) y F (“*punctimacula*” de Colombia). Las secuencias de *Anopheles punctimacula*, se ubican en parafilia en los clados G (G1), E (E2, E3) y F mostrados en las

Fig. 2 y 3. Partiendo de las secuencias topotípicas (obtenidas de ejemplares de la localidad tipo en Panamá), las secuencias de *An. punctimacula* s.s. deben ser consideradas las ubicadas en el subclado E3. Por esta razón, las secuencias ubicadas en el clado E2, correspondientes a Ecuador (Pinault & Hunter, *op. cit.*) pertenecen a otra unidad taxonómica no identificada, al igual que las secuencias de Colombia en los clados G1 (en clado hermano con *An. braziliensis*) y F (en el mismo clado con *An. intermedius*) más alejadas topológicamente (polifilia).

Las secuencias disponibles en GenBank para Ecuador se ubican en un clado único y hermano con secuencias de Panamá y Colombia y una secuencia de Nicaragua, ambas como subclado hermano de las secuencias de *An. malefactor* (E1). La divergencia calculada entre el subclado E2 (Ecuador) versus el subclado E3 (Panamá, Colombia y Nicaragua) está entre 8-11% como especies diferentes. Así mismo, la secuencia de Nicaragua que se ubica como basal en el subclado E3 tiene una divergencia de 8-9% vs el subclado E2 de Ecuador y de 10-13% con el mismo subclado E3 de Colombia y Panamá lo que indica la

Fig. 4. Detalle del clado G y sus subclados. Posición parafilética de las secuencias *oswaldoi* de Pinault & Hunter 2012, con respecto al clado *oswaldoi s.s.* (G3), las secuencias de Ecuador se corresponden con *Anopheles rangeli* (G5). Igualmente se muestra la secuencia parafilética de “*punctimacula*” de Colombia (G1). Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.

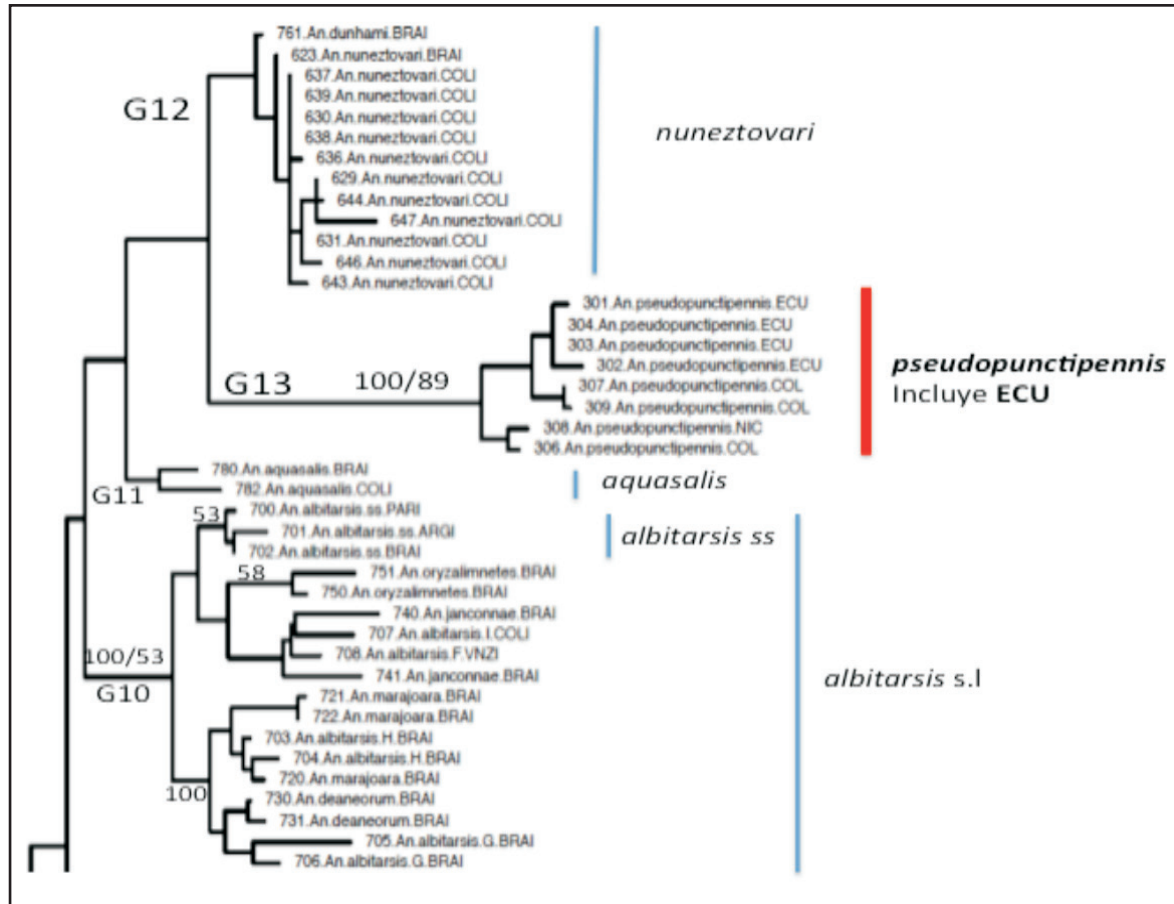


presencia de tres especies diferentes en el Complejo. La divergencia entre *An. malefactor* vs E2 y E3 es de 8-9% y 12-14% respectivamente, demostrando topológicamente y por divergencia la diferencia que llevó a esta especie ser rescatada de sinonimia de *An. punctimacula* (Wilkerson, 1990).

Las secuencias ubicadas en los clados G1 y F, adicionalmente a su posición parafilética, presentan una divergencia de 13% en el nivel de especies distintas (6-14%) al clado E del Complejo *punctimacula*. Una de las secuencias se ubican en un clado hermano de *intermedius* de Brasil (clado F) con una divergencia de 5% y la otra se encuentra basal en el clado G (G1) y cercana a *An. braziliensis* con un 11% de divergencia entre ellas.

El Complejo *punctimacula* presenta entidades de frecuente confusión en la identificación, señalado repetidamente por varios autores desde Wilkerson (1990) y más recientemente por Loaiza *et al.* (2013) y Gómez *et al.* (2015), en la cual *An. punctimacula* es frecuentemente confundida con *An. apicimacula*, *An. calderoni*, *An. neomaculipalpus* y *An. intermedius*, señalado por Gómez *et al.* (2015). La topología mostrada por Gómez *et al. op. cit.* (Fig. 4 pág. 11), con COI+ITS2 se asemeja a la topología aquí mostrada con los clados D (*An. neomaculipalpus*), E1 + E2 + E3 (*An. malefactor* + Ecuador + Nicaragua + *punctimacula s.s.*). Las secuencias de Ecuador y de Nicaragua, así como la secuencia del clado F (con *intermedius*) bien podrían corresponder a *An. calderoni* o *An. apicimacula*. La primera ha sido

Fig. 5. Detalle del clado G, mostrando la monofilia de secuencias de *Anopheles pseudopunctipennis* incluyendo las secuencias de Ecuador. De las secuencias de Ecuador. El clado muestra la monofilia de *albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari* y *An. aquasalis*. Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.



identificada morfológica y molecularmente en el Ecuador (Wilkerson, 1991; González *et al.*, 2010), sin embargo las secuencias disponibles (“barcoding”) no pudieron ser alineadas de manera confiable en las secuencias COI “no barcoding” aquí utilizadas.

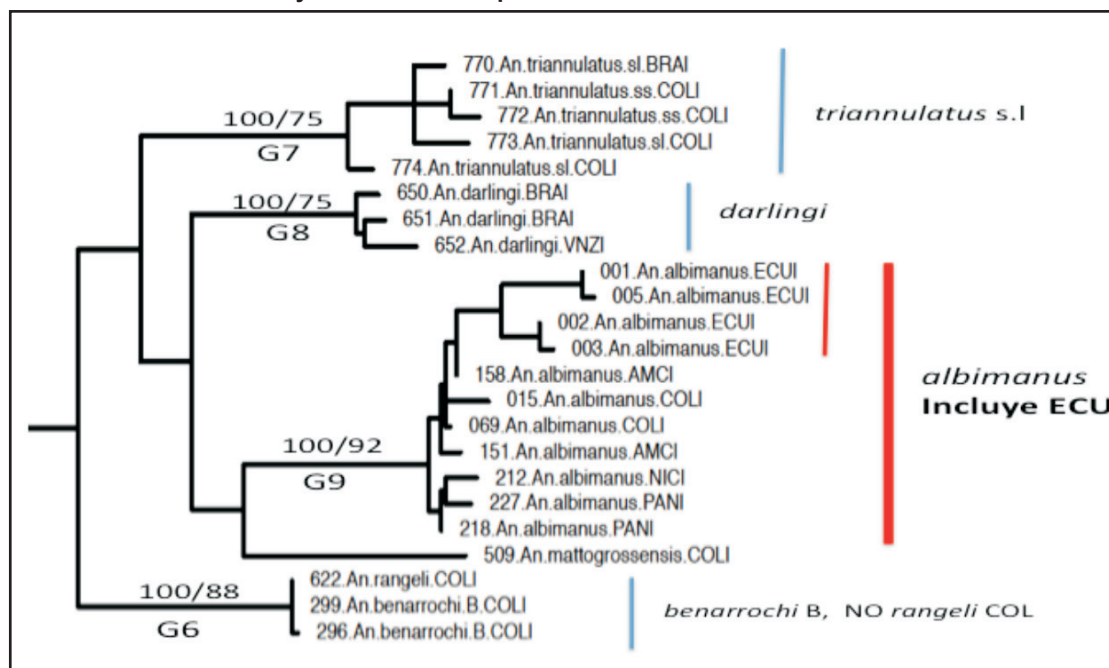
Las secuencias de “*punctimacula*” y *An. intermedius* del clado F, tienen adicionalmente, una divergencia del 5% descartando la posibilidad de ser coespecíficas. Por otra parte, la secuencia “*punctimacula*-Colombia” del subclado G1, se ubicó muy alejada con un 13% de divergencia correspondiendo a un error de identificación, sin embargo es interesante la ubicación única y aislada de la misma correspondiendo a una unidad taxonómica de la cual su identificación probable es de difícil inferencia con la información presente.

Subgénero Nyssorhynchus, Caso Anopheles rangeli, “no oswaldoi”

El subgénero *Nyssorhynchus* es conocido por presentar varios Complejos con especies de difícil identificación y grupos de especies bajo actual confusión, en algunos casos por no tener disponibles holotipos y/o ausencia de caracteres morfológicos diagnósticos claros (ejem. *An. benarrochi*), y en otros por poseer una alta variabilidad fenotípica y genotípica que hace compleja la determinación de unidades taxonómicas inequívocas.

Anopheles oswaldoi s.l. es una de estas especies, lo cual se evidencia en diferentes artículos recientes (Conn, *et al.*, 2013; Orjuela *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz-López *et al.*, 2013; Rubio-

Fig. 6. Detalle del clado G, mostrando la monofilia de las secuencias de *albimanus*, que incluye las secuencias de Ecuador. El clado muestra la monofilia de *triannulatus s.l.* y *An. darlingi*. El subclado G6 muestra la secuencia “no *rangeli*” asociada con 0% de divergencia con *An. benarrochi* B. Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.



Palis *et al.*, 2013; Scarpassa, 2005; Scarpassa & Conn, 2006) y en donde especies como *oswaldoi*, *rangeli* y *benarrochi* están siendo confundidas sin tener una certeza de cual es la unidad taxonómica “correcta”. El complejo *An. oswaldoi* está conformado por al menos cuatro especies (Ruiz-López *et al.*, 2013), siendo su identificación generalmente dificultosa debido a la variación intra-específica y caracteres diagnósticos poco claros (o apomorfias putativas erróneas) entre especies en las fases adulta y en pupa, que hacen dudosa su identificación mediante claves morfológicas y se pueden producir identificaciones incorrectas. Tal es el caso de una variante morfológica de *An. benarrochi*, que en su estadio adulto es fácilmente confundible con *An. oswaldoi* (Quiñones *et al.*, 2001) y en otros casos la descripción de *benarrochi* y caracteres apomórficos putativos en las claves utilizadas puede llevar a confusiones con *An. aquasalis* (Faran, 1980; Navarro *et al.*, 2009), lo que puede ser producto de la misma variabilidad del complejo de especies y/o posibles sinonimias no esclarecidas.

La Fig. 4 (clado G), muestra igualmente parafilia en la ubicación de las secuencias de *An.*

oswaldoi disponibles en GenBank. Esta especie tiene como localidad tipo en Brasil, por lo que asumimos que el subclado G3 se corresponde con la presencia de *oswaldoi* s.s (secuencias de Scarpassa & Conn, 2006, verificadas en Ruiz-López *et al.*, 2013). Este último grupo es basal a dos subclados compuestos por secuencias identificadas como *konderi* + “*oswaldoi* A” (G4) y más internamente al subclado G5 con secuencias de *An. rangeli* + “*An. oswaldoi* Ecuador”. La topología del árbol muestra las secuencias “*oswaldoi*” de Ecuador en el subclado hermano a las secuencias de *An. rangeli* de Colombia, no así con el Complejo *oswaldoi*, sin embargo la divergencia entre las secuencias fue de 3-6% sugiriendo la posibilidad de una entidad taxonómica diferente. No obstante secuencias de *An. nr. konderi* y *An. oswaldoi* B de Ecuador están disponibles (Ruiz-López *et al.*, 2013), éstas son de la porción “barcoding” y no fue posible realizar un alineamiento confiable.

Otra secuencia rotulada como “*rangeli*” se ubica en el subclado G6 junto a secuencias de *benarrochi* B (Fig. 5), ambas secuencias de Orjuela *et al.* (2013), lo que confirma la confusión morfológica

existente en algunos grupos de *Nyssorhynchus*. La divergencia calculada para las secuencias de este subclado fue de 0,0%, resultando idénticas, por tanto asumimos una identificación o rotulación errónea. Asumimos este subclado G6 como *An. benarrochi* B, aún cuando no será posible verificar su validez sin la realización de profundos estudios morfológicos y genéticos debido a la inexistencia del holotipo de *An. benarrochi* y la imposibilidad de coleccionar ejemplares en la localidad tipo en diferentes oportunidades debido a los profundos cambios ecológicos ocurridos en la zona (Navarro & Wilkerson datos no publicados). Esta especie ha sido señalada por diferentes artículos (Estrada *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2009; Orjuela *et al.*, 2013; Quiñones *et al.*, 2001, Ruiz *et al.*, 2005), sin embargo su identidad taxonómica tanto morfológica como molecular está aún por definir.

Casos *pseudopunctipennis*, y *albimanus*: baja variabilidad y congruencia fenotipo-genotipo.

Caso *An. pseudopunctipennis*

Es una especie de amplia distribución en el continente (Rueda *et al.*, 2004, Sinka *et al.*, 2010) y se encuentra con mayor frecuencia en las áreas montañosas (Shannon & Davis, 1927; WRBU, 2013), aunque su distribución altitudinal está entre el nivel del mar hasta por encima de los 3.000 m (Sinka *et al.*, 2010). Su estatus ha sido algo controversial con propuestas de tres poblaciones crípticas (Estrada-Franco, *et al.*, 1992; 1993a; 1993b). Coetzee *et al.* (1999) también señalan tres entidades incluyendo material de Granada (localidad tipo de la especie) y México como una tercera entidad, otros autores señalan un Complejo con dos especies (Casas, 2004; Manguin *et al.*, 1995), mientras que en una geografía más restringida como Argentina, demuestra ser una sola entidad evolutiva (Dantur-Juri *et al.*, 2014).

Las secuencias COI disponibles de *An. pseudopunctipennis* en GenBank provienen de Colombia y Nicaragua se ubican en el subgrupo G13 (Fig. 6) incluyendo las secuencias provenientes de Ecuador lo que confirma su identificación y la presencia en el país tal como ha sido señalado previamente (Levi-Castillo 1944, 1956). Las secuencias de Ecuador muestra una divergencia intra hasta el 1%, mientras que con las secuencias de Colombia y Nicaragua de 2 y 3%, lo que sugiere una variabilidad asociada posiblemente con distancia

geográfica. Lamentablemente, las secuencias COI de Argentina (Dantur *et al.* 2014) no alinearon de forma confiable por ser de una porción diferente de la aquí utilizada.

Caso *An. albimanus*

La especie *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* tiene un amplio intervalo de distribución dominando las zonas bajas y salobres desde México, Centro América, el Caribe y la Costa Pacífica de América del Sur (Guimarães, 1997; Knight-Stone, 1977, Sinka *et al.*, 2012) siendo muy abundante en la costa de Ecuador (datos no publicados de los autores, material de Colección CIZ-UCE). Se le considera una eficiente voladora, que logra dispersarse hasta 3 km desde un punto de liberación experimental (Faran, 1980). En Panamá, los adultos han logrado dispersarse al menos 19 km desde los sitios de cría, cubriendo tal distancia en una serie de vuelos cortos (Rozeboom, 1941), sin embargo no se ha demostrado evidencias morfológicas ni genéticas de posible diferenciación o subpoblaciones a lo largo de su distribución (Black *et al.*, 1988).

Este patrón se observa en el subclado G9 (Fig. 5), donde se muestra la ubicación de una representación (11 secuencias) de la totalidad de las secuencias de *albimanus* utilizadas (124 secuencias, árbol no mostrado) que incluye material proveniente de diferentes autores y desde América Central, Colombia y Ecuador continental y de las Islas Galápagos, sin mostrar estructura filogenética divergente, con fuerte politomía en el árbol total y con una divergencia entre 0-2% entre secuencias de América Central, Colombia y Ecuador (continental e Islas Galápagos) mostrando una alta homogeneidad genética y que evidencia una sola unidad taxonómica. Este resultado muestra la correcta identificación de las secuencias de Ecuador en donde esta especie comparte el mismo ambiente costero que otra similar como lo es *Anopheles aquasalis* Curry (datos no publicados de los autores, Colección CIZ-UCE), ubicadas en el clado distante G11 (Fig. 5) con secuencias de Colombia y Brasil.

Consideraciones finales

El uso de COI en filogenia y taxonomía molecular cada vez cobra más valor, incluyendo el uso mediante el método de "barcoding". En algunos casos y dependiendo del nivel jerárquico en que se trabaja la información puede ser útil para establecer

relaciones evolutivas, mientras que en otros casos es muy útil para establecer unidades taxonómicas (ejem. especies filogenéticas) como los casos que mostrados. Aquí demostramos cómo es posible aclarar límites entre especies diferentes mediante su ubicación en ramas o clados con monofilía recíproca, la topología COI, con base en las localidades tipo de las especies o secuencias disponibles, y con valores de divergencia inter e intra clados, sin asumir en las topologías de los árboles relaciones evolutivas entre grupos.

En este aporte también evidenciamos la existencia de secuencias depositadas en GenBank que no necesariamente están acordes con el rótulo o denominación taxonómica, las cuales en algunos casos han sido identificadas mediante “Blast search”, una herramienta de GenBank-NCBI que realiza alineamientos por %porcentaje de identidad o simple similaridad (no %porcentaje de homología como señalan muchos autores). Un efecto negativo de este proceso es que de no existir secuencias de especies cercanas evolutivamente, la búsqueda arroja una mayor identidad con las secuencias disponibles pero no con aquellas cercanas por homología real. En nuestro caso, las secuencias de dos especies colectadas en Ecuador y de difícil identificación morfológica como *Anopheles punctimacula* y *An. oswaldoi* resultaron ubicadas en nuestro análisis explícito en clados correspondientes a unidades taxonómicas diferentes.

Por esta razón, en análisis de taxonomía molecular, que tiene como objetivo la identificación de unidades taxonómicas, deben construirse hipótesis filogenéticas con métodos de homología (no de distancia) para la corroboración y ubicación correcta de las secuencias/especies a utilizar en el grupo de estudio.

En el presente estudio, corroboramos la presencia de secuencias/especies de *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus*, mientras que corregimos la identificación molecular de secuencias cercanas a *An. rangeli* (no *oswaldoi*) y permanece en duda la identificación correcta de las secuencias relacionadas el grupo *punctimacula* hasta tener disponibles un mayor número de secuencias COI de especies relacionadas. Sin embargo, de acuerdo al criterio de localidad tipo, estas no pertenecen a *An. punctimacula* sensu stricto.

Finalmente, la matriz de ADN-COI de 520 pb de 241 secuencias pertenecientes a 36 especies construida para estos análisis resultará de utilidad para la identificación molecular de especies de anofelinos de Ecuador y del Neotrópico con base en la porción 2.272 pb a 2.792 pb de Citocromo Oxidasa I.

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Prometeo de Senescyt-Ecuador por el financiamiento a J. C. Navarro para su estadia e investigación en el CIZ-UCE, Ecuador. Este trabajo corresponde en parte a la Tesis de Grado de Ingeniería en Biotecnología de G. Arregui en ESPE, Quito, y también parte de la investigación en vectores de la Amazonía de Ecuador de la Unidad de Entomología Aplicada del CIZ. A los revisores anónimos, cuyas sugerencias mejoraron la versión final del manuscrito.

REFERENCIAS

- Black W. & Rai K. (1988). Genome evolution in mosquitos: intraspecific and interspecific variation in repetitive DNA amounts and organization. *Genet. Res.* **51**: 185-196.
- Bourke B. P., Oliveira T. P., Suesdek L., Bergo E. S. & Sallum M. A. M. (2013). A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors.* **6**: 111. doi: 10.1186/1756-3305-6-111.
- Brochero H. H., Li C. & Wilkerson R. C. (2007). A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitalarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreno, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 1113-1117.
- Casas M. (2004). Análisis de la estructura genética de las poblaciones de *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald de la zona identificada como de convergencia poblacional entre México y América Central. Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), 1-71.

- Coetzee M., Estrada-Franco J., Wunderlich C. & Hunt R. (1999). Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med.* **60**: 649-653.
- Conn J. E., Moreno M. E., Saavedra M., Bickersmith S. A., Knoll E., Fernandez R., *et al.* (2013). Molecular Taxonomy of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* (Diptera: Culicidae) and Malaria Epidemiology in Southern Amazonian Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**: 319-324.
- Dantur-Juri M. J., Moreno M., Prado M., Navarro J. C., Zaidenberg M., Almirón W., Claps G. & Conn J. (2014). Demographic history and population structure of *Anopheles pseudopunctipennis* in Argentina based on the mitochondrial COI gene. *Parasites & Vectors.* **7**: 423.
- Dávila J. & Bajaña F. (2009). *Programa de Vigilancia y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores: Paludismo*. Quito, Ecuador: Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Escovar J. E., González R., Quiñones M. L., Wilkerson R. C., Ruiz F. & Harrison B. A. (2014). Morphology of the larvae, male genitalia and DNA sequences of *Anopheles (Kerteszia) pholidotus* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **109**: 473-479.
- Estrada D. A., Quiñones M. L., Sierra D. M., Calle D. A., Ruiz F., Erazo H. F. & Linton Y-M (2003). Utilidad de la morfología de los huevos como un método indirecto para identificar *Anopheles benarrochi* Gabaldón, Cova García & López, *Anopheles oswaldoi* (Peryassú) y *Anopheles rangeli* Gabaldón, Cova García & López, (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomédica.* **23**: 388-395.
- Estrada-Franco J., Ma M., Lanzaro G., Gwadz R., Galvan-Sanchez C., Cespedes J., Vargas-Sagarnaga R., Rodriguez R. *et al.* (1992). Evidencia genética de un complejo de especie en *Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis*. *Bol. Sanit. Panam.* **113**: 297-299.
- Estrada-Franco, J., Lanzaro, G., Ma, M., Walker-Abbey A., Romans P., Galvan-Sanchez C., Cespedes J., Vargas-Sagarnaga R., Laughinghouse A., Columbus I., Gwadz R. *et al.* (1993a). Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis sensu lato* from three countries of Neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 735-745.
- Estrada-Franco J., Ma M., Gwadz R., Sakai R., Lanzaro G., Laughinghouse A., *et al.* (1993b). Evidence through cross mating experiments of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis sensu lato*: a primary malaria vector of the American continent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 746-755.
- Faran M. (1980). Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus Nyssorhynchus of *Anopheles*. Contributions of the American Entomological Institute, **15**: 35-49.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.
- Glez-Peña D., Gómez D., Reboiro M., Fdez F. & Posada D. (2010). ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research.* **38**: 14-18.
- Goloboff P., Farris S. & Nixon K. (2000). TNT (Tree analysis using New Technology) (BETA) ver. xxx Published by the authors, Tucumán, Argentina.
- Gómez G. F., Bickersmith S. A., González R., Conn J. E. & Correa M. M. (2015), Molecular Taxonomy Provides New Insights into *Anopheles* Species of the Neotropical Arribalzagia Series. *PLoS ONE* **10(3)**: e0119488. doi: 10.1371/journal.pone.0119488.
- González R., Carrejo N., Wilkerson R., Alarcon J., Ormasa J., Ruiz F., Bhatia R., Loaiza J. & Linton Y. (2010). Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **105**: 1001-1009.
- Guimarães J. H. (1997). *Systematic Database of Diptera of the Americas South of the United States*

- (Family Culicidae). Editora Plêiade, Fapesp. São Paulo, 110-114.
- Gutiérrez L. A., Orrego L. M., Gómez G. F., López A., Luckhart S., Conn J. E. & Correa M. M. (2010). A new mtDNA COI gene lineage closely related to *Anopheles janconnae* of the *Albitarsis complex* in the Caribbean region of Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**: 1019-1025.
- Harbach R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa.* **1668**: 591-638.
- Harbach R. E. & Kitching I. (2005). Reconsideration of Anopheline phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. *Systematics and Biodiversity.* **3**: 345-374.
- Harbach R. E., Rattarithikul R. & Harrison B. A. (2005). Baimaia, A New Subgenus For *Anopheles kyondawensis* Abraham, A Unique Crabhole-Breeding Anopheline In Southeastern Asia. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **107**: 750-761.
- Higgins D., Thompson J. & Gibson T. (1996). Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology.* **266**: 383-402.
- Knight K. L. & Stone A. (1977). A catalog of mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae). *Thomas Say Found Entomological Society American.* **6**: 1-611.
- Lehr M. A., Kilpatrick C. W., Wilkerson R. C. & Conn J. E. (2005). Cryptic Species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) Complex: Incongruence Between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Identification and Analysis of Mitochondrial DNA COI Gene Sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **98**: 908-917.
- Levi-Castillo R. (1944). El complejo *pseudopunctipennis* en el Ecuador (Diptera: Culicidae). Universidad de Guayaquil. **1944**: 1-7.
- Levi-Castillo R. (1945a). *Anopheles pseudopunctipennis* in the Los Chillos valley of Ecuador. *J. Econ. Entomol.* **38**: 385-390.
- Levi-Castillo R. (1945b) *Los Anofelinos de la República del Ecuador*: Guayaquil, Ecuador: Artes Gráficas Senefelder C.A.
- Levi-Castillo R. (1956). *Provisional List of the Culicidae, Simuliidae, Phlebotomus and Culicoides of Ecuador*: Proceedings of the 10th International Congress of Entomology Montreal (1956) 1958, **3**: 867-872.
- Li C. & Wilkerson R. C. (2005). Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 495-500.
- Linton Y., Pecor J., Porter C., Mitchell L., Garzón-Moreno A., Foley D., Pecor D. & Wilkerson R. (2013). Mosquitoes of eastern Amazonian Ecuador: biodiversity, bionomics and barcodes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **108 (Suppl. I)**: 100-109.
- Loaiza J., Scott M., Bermingham E., Sanjur O., Rovira J., Dutari L., Linton Y., Bickersmith S., & Conn J. (2013). Novel genetic diversity within *Anopheles punctimacula s.l.*: Phylogenetic discrepancy between the Barcode cytochrome c oxidase I (COI) gene and the rDNA second internal transcribed spacer (ITS2). *Acta Trop.* **128**: 61-69.
- Manguin S., Roberts D. R., Peyton E. L., Fernandez-Salas I., Barreto M., Fernandez Loayza R., et al. (1995). Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 362-377.
- McKeon S. N., Lehr M. A., Wilkerson R. C., Ruiz J. F., Sallum M. A., Lima J. B., et al. (2010) Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J.* **9**: 271. doi: 10.1186/1475-2875-9-271 PMID: 20929572.
- Moreno M., Bickersmith S., Harlow W., Hildebrandt J., McKeon S. N., Silva-do-Nascimento T. F., et al. (2013). Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex

- patterns. *Parasit Vectors*. **6**: 47. doi: 10.1186/1756-3305-6-47.
- Motoki M. T., Wilkerson R. C. & Sallum M. A. (2009). The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **104**: 823-850.
- Navarro J. C., Hernández C., Rangel-Díaz G., Guerrero E., Rangel Y. & Arrivillaga J. (2009). Invalidación de autapomorfias putativas mediante análisis de filogenia molecular en *Anopheles* subgénero *Nyssorhynchus*. *Bol. Mal. Salud Amb*. **49**: 223-239.
- OMS (2015). *OMS-malaria*. Documento en línea. Disponible en: http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2014/en/. [Consultado el 10 de Noviembre de 2015].
- Orbe T. (2012). *SciDev.Net. El mosquito de la malaria llega a los Andes del Ecuador*. Documento en línea. Disponible en: <http://www.scidev.net/es/latin-america-and-caribbean/news/el-mosquito-de-la-malaria-llega-a-los-andes-del-ecuador-.html>. [Consultado el 10 de Marzo de 2013]
- Orjuela L. I., Herrera M., Erazo H. & Quiñones M. L. (2013). Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con Plasmodium. *Biomédica*. **23**: 42-52.
- Pinault L. & Hunter F. (2011). New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malaria Journal*. **10**: 236-246.
- Pinault L. & Hunter F. (2012a). Larval habitat associations with human land uses, roads, rivers, and land cover for *Anopheles albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, and *A. punctimacula* (Diptera: Culicidae) in coastal and highland Ecuador. *Frontiers in Physiology*. **3**: 1-9.
- Pinault L. & Hunter F. (2012b). Malaria in Highlands of Ecuador since 1900. *Emerging Infectious Diseases*. **18**: 615-622.
- Pradeep Kumar N., Krishnamoorthy N., Sahu S. S., Rajavel A. R., Sabesan S. & Jambulingam P. (2013). DNA Barcodes indicate members of the *Anopheles fluviatilis* (Diptera: Culicidae) species complex to be conspecific in India. *Mol Ecol Resour*. **13**: 354-361. doi: 10.1111/1755-0998.12076.
- Quiñones M., Harbach R., Calle D., Ruiz F., Erazo H. & Linton Y. (2001). Variante morfológica de adultos hembras de *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomédica*. **21**: 351-359.
- Rosa-Freitas M. G., Lourenço-de-Oliveira R., de Carvalho-Pinto C. J., Flores-Mendoza C. & Silvano-Nascimento T. F. (1998). Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **93**: 651-55.
- Rozeboom L. (1941). Distribution and ecology of the *Anopheles* mosquitoes of the Caribbean region. *American Association for the Advancement of Science*. **15**: 98-107.
- Rozo-López P. & Mengual X. (2015). Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *Zookeys*. **513**: 39-64. doi: 10.3897/zookeys.513.9561.
- Rubio Y. & Zimmerman R. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Entomol*. **34**: 499-510.
- Rubio-Palis Y., Ruiz-López F., Guzmán H., Sánchez V., Moreno J. E., Estrada Y., Bevilacqua M. & Cárdenas L. (2013). Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* B y *Anopheles (Nys.) albitarsis* F en la cuenca del río Caura, Estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb*. **53**: 68-72.
- Rueda L., Peyton E. L. & Manguin, S. (2004) *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae): Neotype designation and description. *J. Med. Entomol*. **41**: 12-22.
- Ruiz F., Quiñones M. L., Erazo H. F., Calle D. A., Alzate J. F. & Linton Y. M. (2005). Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from

- southern Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 155-160.
- Ruiz-Lopez F., Linton Y. M., Ponsonby D. J., Conn J. E., Herrera M., Quiñones M. L., Velez I. D. & Wilkerson R. C. (2010). Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**: 899-903.
- Ruiz-Lopez F., Wilkerson R. C., Conn J. E., McKeon S. N., Levin D. M., Quiñones M. L., Pova M. M. & Linton Y. M. (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors.* **5**: 44.
- Ruiz-López F., Wilkerson R. C., Ponsonby D. J., Herrera M., Sallum M. A. M, Velez I. D., *et al.* (2013). Systematics of the *Oswaldoi* complex (*Anopheles, Nyssorhynchus*) in South America. *Parasites & Vectors.* **6**: 324. doi: 10.1186/1756-3305-6-324.
- Rutar T., Baldomar E. & Maguire J. (2004). Introduced *Plasmodium vivax* malaria in a Bolivian community at an altitude of 2,400 meters. *Am. J. Trop. Med.* **1**: 15-19.
- Salazar N., Fernández W., Iannac J., Morales A. & Espinoza M. (2006). Comparación de dos métodos de colecta para Anophelinos (cebo humano y trampa de luz CDC), durante la época seca y lluviosa, Yurimaguas, Perú 2005. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* **23**: 87-97.
- Sallum M. A. M., Wilkerson R. C. & Forattini O. P. (1999). Taxonomic Study of Species Formerly Identified as *Anopheles mediopunctatus* and Resurrection of *An. costai* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **36**: 282-300.
- Sallum M. A. M., Schultz T. & Wilkerson R. (2000). Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) based on morphological characters. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **93**: 745-775.
- Sallum M. A. M., Schultz T., Foster P., Aronstein K., Wirtz R. & Wilkerson R. (2002). Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Systematic Entomology.* **27**: 361-382.
- Sallum M. A., Marrelli M. T., Nagaki S. S., Laporta G. Z. & Dos Santos C. L. (2008). Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J. Med. Entomol.* **45**: 970-981.
- Scarpassa V. M. (2005). Isozyme similarity in *Anopheles oswaldoi sensu lato* (Diptera: Culicidae) from the Amazon Region, Brazil. *J. Med. Entomol.* **42**: 319-326.
- Scarpassa V. M. & Conn J. E. (2006). Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi sensu lato* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genet. Mol. Res.* **5**: 493-502.
- Shannon R. & Davis N. (1927). La distribución del *Anopheles pseudopunctipennis* y su relación con el paludismo, en la Argentina. *Rev. Inst. Bacteriol.* **4**: 680-705.
- Sinka M. E., Rubio-Palis Y., Manguin S., Patil A. P., Temperley W. H., Gething P. W., *et al.* (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors.* **3**: 72. doi: 10.1186/1756-3305-3-72. Erratum in: *Parasit Vectors.* **4**: 210.
- Sinka M. E., Bangs M. J., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphap T., Coetzee M., *et al.* (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors.* **5**: 69. doi: 10.1186/1756-3305-5-69.
- Swofford D. L. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A. & Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* **30**: 2725-2729.
- Wijit A., Saeung A., Baimai V., Otsuka Y., Thongsahuan S., Taai K., *et al.* (2013). DNA barcoding for the identification of eight species members of the

- Thai Hyrcanus Group and investigation of their stenogamous behavior. *C R Biol.* **336**: 449-456. doi: 10.1016/j.crvi.2013.08.001.
- Wilkerson R. C. (1990). Redescription of *Anopheles punctimacula* and *An. malefactor* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **27**: 225-275.
- Wilkerson, R.C. (1991). *Anopheles (Anopheles) calderoni* n. sp. a malaria vector of the Arribalzagia Sries from Perú (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **23**: 25-38, illus.
- Wilkerson R. C. & Sallum M. A. M. (1999). *Anopheles (Anopheles) forattinii*: a New Species in Series Arribalzagia (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **36**: 345-354.
- Wilkerson R. C., Foster P. G., Li C. & Sallum M. A. (2005). Molecular Phylogeny of Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Species Complex (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **98**: 918-925.
- WMR (2014). *World Malaria Report, 2014*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2015 en. http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_ecu_en.pdf.
- WRBU (2013). The Walter Reed Biosystematics Unit. Recuperado el 20 de Marzo de 2015, de http://wrbu.si.edu/speciespages_ano/ano_a-hab/analb_hab.html
- Zavortink T. (1979). Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A Review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contr. Am. Ent. Inst.* **9**: 1-54.

Recibido el 26/05/2015
Aceptado el 02/12/2015

Intervención educativa para modificar conocimientos, actitudes y prácticas sobre la malaria en escolares indígenas Ye'kwana

Educational intervention to modify knowledge, attitudes and practices about malaria in Ye'kwana schools

Mariapia Bevilacqua¹, Luis Gonzalo Morales², Lya Cárdenas¹ & José Domínguez³

RESUMEN

En zonas endémicas y remotas con población indígena vulnerable, es necesario aplicar medidas que contribuyan a contrarrestar el aumento de la malaria, adicionales al diagnóstico temprano, tratamiento y control vectorial. Se evalúa el cambio en niveles de conocimiento, actitudes y prácticas (CAP) en relación a la prevención y control de la malaria en una población escolar indígena de nivel primario, luego de la aplicación de un proyecto pedagógico de aula. Se realizó una evaluación cuantitativa, siguiendo un diseño cuasi-experimental, tipo preintervención y postintervención de carácter exploratorio, con población escolar de 3er y 4to grado, en cinco comunidades del pueblo Ye'kwana de la cuenca del río Caura (Estado Bolívar, Venezuela). Docentes interculturales bilingües, previo consentimiento informado, realizaron la intervención educativa y evaluaron resultados con el uso de un cuestionario sobre conocimientos, actitudes y prácticas traducido al Ye'kwana. Se analizaron los datos de la intervención mediante prueba de rangos con signo de Wilcoxon para datos pareados (prueba de dos colas), antes de la intervención (T1), al finalizar la misma (T2) y un tiempo después de la intervención (T3=45-60 días). En el intervalo T1-T3 se registraron cambios positivos y mejoras significativas ($P<0,05$) en todas las preguntas de conocimiento, y en el área de actitud hubo cambios no significativos. En el área de práctica para el control de la malaria, las respuestas registradas fueron mixtas. Los resultados indican que el proyecto pedagógico de aula evaluado puede ser muy útil en la prevención y control de la malaria, desde las escuelas comunitarias indígenas.

Palabras clave: malaria, ecosalud, Ye'kwana, intervención educativa, Caura.

SUMMARY

In remote areas with endemic and vulnerable indigenous population, it is necessary to implement measures that help to offset the increase of malaria, in addition to the early diagnosis, treatment and vector control. Here, we evaluate a classroom project to change levels of knowledge, attitudes and practices (KAP) in relation to the prevention and control of malaria in amerindian school population of primary level. We carried out a quantitative assessment, under a quasi-experimental "before and after" design, with children from 3rd and 4th grades in five Ye'kwana communities in the Caura River Basin (Bolívar State, Venezuela). According to previously informed community consent, intercultural bilingual teachers performed and evaluated results of the educational intervention using a questionnaire on knowledge, attitudes and practices translated into Ye'kwana language. Intervention data were analyzed by Wilcoxon signed paired tests. We compared differences between before intervention (T1), immediately after (T2), and also some time after the intervention (T3 = 45-60 days). In the T1-T3 interval significant improvements ($P<0.05$) were recorded in all questions of knowledge and a positive, non-significant changes in all attitude questions. Changes in practices for malaria prevention were mixed. The results show the potential for the classroom-teaching project tested to assist in the prevention and control of malaria at indigenous community schools.

Key words: malaria, ecohealth, Ye'kwana, educational intervention, Caura.

INTRODUCCIÓN

Para Venezuela el desafío de prevenir y controlar la malaria supone abordarla enérgicamente en la región Guayana, especialmente en el estado

Bolívar, donde se concentra más de 87,7% de los casos. Entre los años 2012 y 2014 en dicho estado el número de casos aumentó de 44.150 a 71.802 y hasta la semana epidemiológica 22 del 2015, se registra un acumulado de 40.107 casos (MPPS, 2012, 2014,

¹ Asociación Venezolana para la Conservación de Áreas Naturales (ACOANA), Caracas, Venezuela

² Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³ Organización Indígena del Caura KUYUJANI, Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela.

2015). El estado Bolívar está en epidemia de malaria desde hace más de un quinquenio, a pesar de que en el país existe la experticia en la erradicación de la malaria (Gabaldón, 1983).

Una revisión de los Boletines Epidemiológicos a nivel de parroquias en el área de estudio de este trabajo, la cuenca del río Caura (municipios Sucre y Cedeño), revela que el patrón de incremento de la malaria es similar al registrado en el estado Bolívar para el mismo período (Tabla I). Resulta igualmente alarmante, que para el año 2014 el total nacional de casos de malaria en grupos etarios de edad pre-escolar, escolar y bachillerato (intervalo 0-19 años) igualó al número de casos en grupos etarios de edad laboral activa (intervalo 30-49 años), situación que sugiere la transmisión activa de la malaria en el hogar, así como una condición creciente de vulnerabilidad en niños, niñas y adolescentes en Venezuela.

Estudios previos explican la prevalencia de la enfermedad al sur de país debido a la reducción del presupuesto para las actividades del programa de malaria, el aumento de la actividad minera, la migración de la población a zonas endémicas, el comportamiento exofílico del vector, y fronteras remotas donde las actividades de control son difíciles de poner en práctica (Sandoval de Mora 1997; Moreno *et al.*, 2007). Por su parte, Medina *et al.* (2011) señalan que la cuenca del río Caura es ambientalmente favorable para la transmisión de la malaria porque las zonas de riesgo muy alto a bajo se distribuyen en toda la cuenca y ocupan más de 90% de su superficie. Asimismo sugieren que los paisajes surcados por la red de drenajes en zonas de riesgo, son de importancia epidemiológica por su vinculación

con la dispersión de la malaria a través de corredores ribereños, utilizados ampliamente por la población local.

Pocos estudios investigan la transmisión de la malaria en comunidades amerindias al sur de Venezuela y solo algunos, analizan el comportamiento individual como elemento determinante en su prevalencia. Bevilacqua *et al.* (2009; 2015) identifican diversos factores que explican la presencia de la malaria en áreas remotas con población indígena en la cuenca del río Caura, incluyendo aquellos relacionados con el comportamiento y la educación para la salud: a) desconocimiento general de la enfermedad, sus causas, síntomas, tratamiento y prevención; b) falta de valoración y abandono paulatino de los sistemas tradicionales para la prevención y control de la malaria, adherencia insuficiente al tratamiento antimalárico y uso limitado del mosquitero; c) educación y sensibilización deficiente en los hogares y la comunidad, y d) baja participación y empoderamiento local en la identificación y adecuación de respuestas para la prevención y control de la malaria, a nivel de individuo, hogar y comunidad.

Hay razones para pensar que el aumento en la incidencia de la malaria en el sur de Venezuela puede estar asociado a la ausencia de un enfoque sistémico en el programa de control de la enfermedad y de acciones en educación para salud dirigido a las poblaciones más afectadas (Bevilacqua *et al.*, 2015). La evidencia disponible muestra que las intervenciones utilizadas globalmente para reducir la prevalencia de la enfermedad en áreas endémicas (Ej. diagnóstico temprano y tratamiento, rociamiento intradomiciliario con insecticidas residuales, mosquiteros tratados con insecticidas, entre otros) no funcionarán como se espera a menos que las personas, sus familias y comunidades entiendan claramente "quién debe hacer qué" y, las responsabilidades individuales para neutralizar la red de factores que mantienen a la enfermedad en sus hogares y territorios.

Diversos estudios dan cuenta del éxito de intervenciones educativas en la modificación de conductas nutricionales (Sánchez *et al.*, 2014; Pérez & Delgado 2012) y en la prevención de la malaria y dengue (Suárez-Mutis *et al.*, 2011; Alvarado *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 1995), así como la pertinencia en el uso de encuestas sobre conocimiento, actitudes y prácticas (CAP), como herramienta para el abordaje

Tabla I. Número de casos de malaria en los años 2012 y 2014 en la región del río Caura, Parroquias del Municipio Sucre del Estado Bolívar, Venezuela (MPPS, 2012; 2014).

Parroquia	2012	2014
Aripao	620	1.586
Guarataro	463	349
Las Majadas	160	73
Maripa	378	760
Moitaco	295	600
Total	1.916	3.368

intercultural de la malaria (OPS, 2008, Sojo-Milano *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2003). En Venezuela no encontramos experiencia de intervenciones educativas interculturales bilingües en salud y posterior evaluación de su impacto en la modificación de conocimiento y conductas en población escolar indígena. Por presentarse en el estado Bolívar las áreas con mayor transmisión de malaria del país en las últimas dos décadas, es necesario y urgente incorporar la perspectiva de educación para abordar la eliminación de la malaria local en áreas remotas con población amerindia, desde la escuela y con la movilización de toda la comunidad.

En este artículo se evalúan los cambios de conocimientos, actitudes y prácticas vinculados a la prevención y control de malaria en escolares indígenas, producto de la instrumentación de un proyecto pedagógico de aula, en comunidades indígenas remotas de la cuenca del río Caura, estado Bolívar, Venezuela. La intervención educativa con enfoque de ecosalud se llevó a la práctica mediante la participación de docentes interculturales bilingües y la participación activa de agentes de salud comunitarios, quienes desarrollan áreas de conocimiento del currículo nacional vigente del sistema de educación primaria (matemática, ciencias naturales y sociedad), utilizando contenidos sobre la malaria de forma transversal en la estrategia de enseñanza-aprendizaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y selección de comunidades

El área de estudio se localiza al sur de Venezuela, en zonas remotas de la cuenca del río Caura, municipios Sucre y Cedeño del estado Bolívar, en la región central del Escudo Guayanés venezolano (Fig. 1), descrita en trabajos previos (Bevilacqua & Ochoa 2001; Bevilacqua *et al.*, 2009; Colchester *et al.*, 2004; Machado-Allison *et al.*, 2003; Rosales *et al.*, 2003). Para este estudio fueron seleccionadas las siguientes comunidades del pueblo Ye'kwana: Jüwütünña (Santa María de Erebató), Anadekenña (Boca de Piña) y Sayusorinña (Boca de Cusime) en el río Erebató; Wüñküyadinña (Boca de Nichare) en el bajo río Caura y Kanadakuni en el alto río Caura. Esta selección se hizo, considerando la representatividad geográfica, homogeneidad cultural, presencia de ambulatorios y agentes de

salud comunitaria, así como el acceso logístico y el compromiso de los docentes comunitarios para aplicar el proyecto de aula.

Descripción de la intervención y evaluación

La intervención educativa consistió en la aplicación de un proyecto pedagógico de aula sobre la malaria dirigida a escolares de las comunidades antes mencionadas, para la enseñanza de contenidos dirigidos a fomentar conocimientos, actitudes y prácticas hacia la prevención y control de la malaria. La intervención se aplicó a toda la población escolar de 3er y 4to grado de nivel primario en cinco escuelas, siguiendo los lineamientos establecidos en la “*Guía Pedagógica del Docente Comunitario para la prevención y el control de la malaria en poblaciones indígenas de la cuenca del río Caura, estado Bolívar*”, el cual adapta resultados de una investigación epidemiológica sobre malaria con enfoque de ecosalud en la cuenca del río Caura, para la enseñanza de contenidos de ciencias y matemática del currículo bolivariano de educación primaria (Bevilacqua *et al.*, 2012). La selección del grupo meta de 3er y 4to grado se basó en los siguientes criterios: a) disponen de competencias cognitivas-intelectuales, cognitivas-motrices y cognitivas-afectivas de interés al estudio piloto y, b) la guía pedagógica pertinente al Proyecto de Aula sobre La Malaria, la cual desarrolla contenidos escolarizados para la enseñanza del currículo de educación primaria de 3er y 4to grados (Bevilacqua *et al.*, 2012). En todas las escuelas se

Fig. 1. Localización nacional y regional de la cuenca del río Caura, estado Bolívar, Venezuela.



aplicaron las actividades 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14 y 16 de la guía pedagógica en cuestión, con estrategias de enseñanza-aprendizaje similares y pertinencia local en términos ambientales, culturales, sociales, económicos y epidemiológicos. El trabajo de campo fue liderado por un equipo indígena conformado por ocho docentes interculturales bilingües y un coordinador educativo y facilitador, responsable de las traducciones Castellano-Ye'kwana-Castellano, quienes fueron previamente capacitados para tal fin. El estudio contó con el consentimiento previo informado de la Organización Indígena del Caura KUYUJANI, otorgado en asamblea anual y de cada docente intercultural bilingüe participante.

Se hizo una evaluación de los cambios en conocimientos, actitudes y prácticas (CAP), de forma cuantitativa, con diseño cuasi experimental tipo pretratamiento y postratamiento, sin grupo control, entre marzo-diciembre de 2014. Se elaboró un cuestionario con base en la revisión de estudios similares (OPS, 2008; Alvarado *et al.*, 2006) y la consulta académica a especialistas en el área de planeamiento y desarrollo curricular de educación primaria, el Dr. Jorge Luis Altuve y la Dra. Gladys Villarroel, en estudios en ciencias sociales, ambos investigadores de la Escuela de Educación de la Universidad Central de Venezuela. El cuestionario consta de nueve preguntas independientes sobre la malaria en las áreas de conocimiento (ciclo de transmisión y causas de la enfermedad, preguntas 1, 2, 3 y 4), actitud hacia la enfermedad (interés en conocer y participar en actividades de prevención y control: preguntas 5 y 6) y prácticas relativas a su prevención y control (uso de mosquiteros y adherencia al tratamiento: preguntas 7, 8 y 9).

Los docentes indígenas aplicaron un cuestionario en forma oral e individual en lengua Ye'kwana a cada escolar antes de la intervención educativa (T1) y el investigador principal registró las respuestas en una planilla, con el apoyo del facilitador traductor indígena. Posteriormente, este procedimiento fue repetido por los docentes al finalizar la intervención educativa (T2) y entre uno y cuatro meses después de finalizar la intervención (T3). Su aplicación se hizo sin validación previa por lo remoto de las comunidades indígenas y limitaciones presupuestarias para realizar una segunda visita. Los cuestionarios respondidos fueron remitidos por los docentes a los investigadores, quienes transcribieron

y estandarizaron los datos en hojas electrónicas de cálculo Microsoft® Excel®. A cada respuesta se le asignó un puntaje de 1 a 4, excepto en la pregunta 4, cuyo máximo valor fue de tres puntos. Los puntajes altos (ej. 3 ó 4) indican un mayor nivel de conocimientos, actitudes más acertadas, o prácticas que favorecen la prevención y el control de la enfermedad. Las alternativas “no sabe” y “no contesta” se codificaron con un valor de uno, mínimo valor de la escala.

Análisis de datos

Los resultados de la intervención se evaluaron comparando entre sí los puntajes de los cursantes en T1, T2 y T3 mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para datos pareados (prueba de dos colas). La hipótesis nula de la prueba fue que la mediana de las diferencias en puntaje entre dos tiempos distintos es cero. Las pruebas estadísticas se hicieron con el programa SPSS versión 17.0. Las respuestas se evaluaron por separado según la pregunta y se tomó como nivel crítico de significación $\alpha=0,05$. Se compararon las respuestas de los cuestionarios aplicados entre T1 vs T2, entre T2 vs T3 y entre T1 vs T3. Las comparaciones de la prueba de Wilcoxon se hicieron en el sentido T2-T1, T3-T2 y T3-T1, de modo que en las tablas de significación de los cambios, los aumentos de puntuación se basan en diferencias negativas de rango y las reducciones se basan en diferencias positivas de rango. En cada tabla se indica el sentido del cambio de puntuación y en cuáles rangos está basado cada valor de probabilidad. Para un examen más detallado de los cambios, los valores de puntuación media y mediana de cada prueba y cada pregunta se muestran en tablas separadas.

RESULTADOS

Población de estudiantes participantes

En total participaron 89 estudiantes, distribuidos de la siguiente manera: 76 estudiantes en el cuestionario T1, 72 estudiantes en el cuestionario T2 y 34 estudiantes en el cuestionario T3. Puesto que no todos los alumnos participaron en los tres cuestionarios (Tabla II), en las distintas pruebas pareadas hubo distintos tamaños muestrales. Por tanto, se hicieron comparaciones entre escolares que

Tabla II. Puntuaciones por pregunta* de los 23 escolares de la Serie A.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Prueba pre-intervención (T1)									
Media	2,04	2,13	2,09	2,22	3,74	3,65	2,83	3,22	3,22
Mediana	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00	3,00	3,00	3,00
Mínimo	1	1	1	1	1	1	2	1	1
Máximo	3	3	3	3	4	4	4	4	4
Prueba post-intervención (T2)									
Media	1,96	2,91	2,39	2,87	3,65	3,61	2,04	2,74	2,83
Mediana	2,00	3,00	2,00	3,00	4,00	4,00	2,00	3,00	3,00
Mínimo	1	2	1	2	1	1	1	2	1
Máximo	3	4	4	3	4	4	3	4	3
Prueba post-intervención (T3)									
Media	2,74	3,04	2,70	2,74	3,35	3,17	3,30	3,57	3,74
Mediana	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	4,00	4,00	4,00
Mínimo	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	4	4	3	3	4	4	4	4	4

*Preguntas: P1 ¿Qué es la malaria?, P2 ¿Cuál es el ciclo de la malaria?, P3 ¿Cuáles son las causas de la malaria?, P4 ¿Has escuchado hablar de la malaria?, P5 ¿Te gustaría aprender más sobre la malaria?, P6 ¿Te gustaría participar en actividades para reducir la malaria?, P7 ¿Usas el mosquitero cuando vas a dormir?, P8 Cuando tienes fiebre ¿le pides a tu mamá ó papá que te lleve al ambulatorio?, P9 Cuando alguien de tu familia tiene malaria ¿le pides que se tome todas las pastillas que le mandó el enfermero?.

participaron en T1, T2 y T3, llamada Serie A con n=23 y estudiantes que participaron en al menos dos de ellos y que conforman la Serie B, la cual incluye n=59 para la prueba T1-T2 y n=33 para la prueba T2-T3.

Serie A. Participantes en todos los cuestionarios (T1, T2 y T3)

Los detalles de las puntuaciones por pregunta y por prueba se muestran en la Tabla II.

En el área de conocimientos, entre T1 y T2 y entre T2 y T3, hubo mejoras significativas o bien cambios no significativos (en ambos sentidos) que produjeron una mejora neta significativa entre T1 y T3 en las cuatro preguntas (Tabla III). En el área de actitudes, tanto entre T1 y T2 como entre T2 y T3, hubo descensos no significativos que no produjeron cambios netos significativos entre T1 y T3 (Tabla III). En cuanto a las prácticas, entre T1 y T2 hubo dos cambios negativos y significativos, mientras que entre T2 y T3 todos los cambios fueron mejoras significativas (Tabla III). Entre T1 y T3, sólo hubo un cambio neto (Pregunta 9, mejoría significativa).

Serie B. Participantes en al menos dos cuestionarios (T1 vs T2 y T2 vs T3)

Los detalles de las puntuaciones por pregunta y por prueba T1 vs T2 se muestran en la Tabla IV. En la prueba T1 vs T2 hubo mejoras en cinco preguntas y desmejoras en cuatro, pero sólo se registran cambios significativos (positivos) en las preguntas dos y cuatro del área de conocimientos (Tabla V); en lo demás los cambios no fueron significativos. Los detalles de las puntuaciones por pregunta y por prueba T2 vs T3 se muestran en la Tabla VI. En la prueba T2 vs T3 una pregunta del área de conocimientos (P1) y las tres del área práctica mostraron mejorías significativas, el resto no mostró cambios significativos (Tabla VII).

DISCUSIÓN

En los resultados de la intervención en la Serie A y Serie B, se observa un patrón de mejoras estadísticamente significativas en el nivel de conocimiento sobre la malaria en los escolares después de la intervención educativa, y este progreso ocurre en las tres combinaciones de tiempos de evaluación: T1 vs T2, T2 vs T3 y T1 vs T3. En otras

Tabla III. Significación de las pruebas pareadas Wilcoxon por pregunta* de los 23 escolares de la Serie A.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Prueba T1 vs T2									
Valor de Z	-0,632a	-3,051b	-1,342b	-2,950b	-0,106a	-0,138b	-2,763a	-2,399a	-1,889a
Significación	0,527	0,002	0,180	0,003	0,915	0,890	0,006	0,016	0,059
Prueba T2 vs T3									
Valor de Z	-3,819a	-0,905a	-1,410a	-0,905b	-1,253b	-1,667b	-3,249a	-3,266a	-3,911a
Significación	0,000	0,366	0,159	0,366	0,210	0,095	0,001	0,001	0,000
Prueba T1 vs T3									
Valor de Z	-2,893a	-3,463a	-2,952a	-2,364a	-1,659b	-1,869b	-1,896a	-1,469a	-2,195a
Significación	0,004	0,001	0,003	0,018	0,097	0,062	0,058	0,142	0,028

a. Basado en los rangos positivos. b. Basado en los rangos negativos.

* Preguntas: P1 ¿Qué es la malaria?, P2 ¿Cuál es el ciclo de la malaria?, P3 ¿Cuáles son las causas de la malaria?, P4 ¿Has escuchado hablar de la malaria?, P5 ¿Te gustaría aprender más sobre la malaria?, P6 ¿Te gustaría participar en actividades para reducir la malaria?, P7 ¿Usas el mosquitero cuando vas a dormir?, P8 Cuando tienes fiebre ¿le pides a tu mamá ó papá que te lleve al ambulatorio?, P9 Cuando alguien de tu familia tiene malaria ¿le pides que se tome todas las pastillas que le mandó el enfermero?.

Tabla IV. Puntuaciones por pregunta* de los 59 escolares de la prueba T1 vs T2, Serie B.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Prueba pre-intervención (T1)									
Media	2,36	2,34	2,34	2,61	3,76	3,68	2,66	3,12	2,85
Mediana	2,00	2,00	2,00	3,00	4,00	4,00	3,00	3,00	3,00
Mínimo	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	3	3	4	3	4	4	4	4	4
Prueba post-intervención (T2)									
Media	2,15	2,80	2,44	2,83	3,80	3,69	2,41	2,92	2,63
Mediana	2,00	3,00	2,00	3,00	4,00	4,00	3,00	3,00	3,00
Mínimo	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Máximo	3	4	4	3	4	4	4	4	4

* Preguntas: P1 ¿Qué es la malaria?, P2 ¿Cuál es el ciclo de la malaria?, P3 ¿Cuáles son las causas de la malaria?, P4 ¿Has escuchado hablar de la malaria?, P5 ¿Te gustaría aprender más sobre la malaria?, P6 ¿Te gustaría participar en actividades para reducir la malaria?, P7 ¿Usas el mosquitero cuando vas a dormir?, P8 Cuando tienes fiebre ¿le pides a tu mamá ó papá que te lleve al ambulatorio?, P9 Cuando alguien de tu familia tiene malaria ¿le pides que se tome todas las pastillas que le mandó el enfermero?.

Tabla V. Significación de las pruebas pareadas Wilcoxon por pregunta* de los 59 escolares de la prueba T1 vs T2, Serie B.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Valor de Z	-1,855a	-2,509b	-0,425b	-2,034b	-0,248b	-0,257b	-1,744a	-1,430a	-1,591a
Significación	0,064	0,012	0,671	0,042	0,804	0,797	0,081	0,153	0,112

a. Basado en los rangos positivos, b. Basado en los rangos negativos.

* Preguntas: P1 ¿Qué es la malaria?, P2 ¿Cuál es el ciclo de la malaria?, P3 ¿Cuáles son las causas de la malaria?, P4 ¿Has escuchado hablar de la malaria?, P5 ¿Te gustaría aprender más sobre la malaria?, P6 ¿Te gustaría participar en actividades para reducir la malaria?, P7 ¿Usas el mosquitero cuando vas a dormir?, P8 Cuando tienes fiebre ¿le pides a tu mamá ó papá que te lleve al ambulatorio?, P9 Cuando alguien de tu familia tiene malaria ¿le pides que se tome todas las pastillas que le mandó el enfermero?.

Tabla VI. Puntuaciones por pregunta* de los 33 escolares de la prueba T2 vs T3, Serie B.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
PruebaT2									
Media	2,06	2,94	2,48	2,88	3,64	3,58	2,15	2,73	2,85
Mediana	2,00	3,00	2,00	3,00	4,00	4,00	2,00	3,00	3,00
Mínimo	1	2	1	2	1	1	1	2	1
Máximo	3	4	4	3	4	4	4	4	4
Prueba T3									
Media	2,67	3,18	2,73	2,79	3,45	3,33	3,27	3,53	3,67
Mediana	3,00	3,00	3,00	3,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00
Mínimo	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	4	4	3	3	4	4	4	4	4

* Preguntas: P1 ¿Qué es la malaria?, P2 ¿Cuál es el ciclo de la malaria?, P3 ¿Cuáles son las causas de la malaria?, P4 ¿Has escuchado hablar de la malaria?, P5 ¿Te gustaría aprender más sobre la malaria?, P6 ¿Te gustaría participar en actividades para reducir la malaria?, P7 ¿Usas el mosquitero cuando vas a dormir?, P8 Cuando tienes fiebre ¿le pides a tu mamá ó papá que te lleve al ambulatorio?, P9 Cuando alguien de tu familia tiene malaria ¿le pides que se tome todas las pastillas que le mandó el enfermero?.

Tabla VII. Significación de las pruebas pareadas Wilcoxon por pregunta* de los 33 escolares de la prueba T2 vs T3, Serie B.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Valor de Z	-3,522a	-1,795a	-1,421a	-0,832b	-0,875b	-1,247b	-3,689a	-3,735a	-4,184a
Significación	0,000	0,073	0,155	0,405	0,382	0,213	0,000	0,000	0,000

a. Basado en los rangos positivos, b. Basado en los rangos negativos.

* Preguntas: P1 ¿Qué es la malaria?, P2 ¿Cuál es el ciclo de la malaria?, P3 ¿Cuáles son las causas de la malaria?, P4 ¿Has escuchado hablar de la malaria?, P5 ¿Te gustaría aprender más sobre la malaria?, P6 ¿Te gustaría participar en actividades para reducir la malaria?, P7 ¿Usas el mosquitero cuando vas a dormir?, P8 Cuando tienes fiebre ¿le pides a tu mamá ó papá que te lleve al ambulatorio?, P9 Cuando alguien de tu familia tiene malaria ¿le pides que se tome todas las pastillas que le mandó el enfermero?.

palabras, luego de ejecutar el proyecto de aula las niñas y los niños entrevistados reconocen la malaria como una enfermedad producida por la picada de un mosquito vector y por parásitos que tienen un ciclo de vida en el sistema circulatorio del cuerpo humano. También reconocen, entre las causas de la malaria, la presencia del mosquito adulto, el agua y los criaderos en el bosque. El resultado es muy alentador, al considerar que transcurridos entre uno y cuatro meses, se conservó el conocimiento sobre la malaria impartido en la escuela. Sin embargo, después de la intervención, la mayoría de los escolares no identificaron ni recordaron otros factores determinantes de la prevalencia de la malaria (ej. deforestación, minería, viajes a lugares de riesgo y falta de adherencia al tratamiento), tratados durante el proyecto de aula. Atribuimos este resultado a varios factores, entre los cuales se destacan: a) la dificultad en los niños para comprender la relación

entre esos factores y la malaria, b) tiempo insuficiente para que los docentes desarrollen y consoliden sus conocimientos sobre las causas de la malaria en las comunidades indígenas del Caura, y c) limitaciones de los docentes para el uso de recursos pedagógicos de enseñanza-aprendizaje pertinentes al proyecto de aula.

Respecto a la actitud hacia la enfermedad, ambas series presentaron una tendencia a disminuciones leves, no significativas (con una excepción), en todos los períodos de evaluación. Altos puntajes promedio en las preguntas ¿te gustaría aprender más sobre la malaria? y ¿te gustaría participar en actividades para reducir la malaria? en T1, indican un contacto previo de los escolares con el tema de la malaria, lo cual se corrobora por la alta frecuencia de respuestas positivas a la pregunta ¿has escuchado hablar de la malaria?, observado en los altos valores de medias y medianas en T1. La preexistencia de un alto nivel de conocimientos

y sensibilización respecto a la malaria, puede atribuirse a la presencia de ambulatorios y personal de salud que realiza actividades de diagnóstico y actividades de sensibilización en las comunidades. Estos resultados coinciden con otros estudios sobre conocimientos, actitudes y prácticas vinculadas a la malaria en poblaciones indígenas y rurales expuestas a la enfermedad. Estos estudios reportan que la población tiene conocimientos generales de la enfermedad, sus síntomas y del vector, antes de las intervenciones (Alvarado *et al.*, 2006; OPS 2008; Rodríguez *et al.*, 2003).

En cuanto a las prácticas para la prevención y el control de la malaria, excepto para la Serie A (T1 vs T2), se encontraron mejoras significativas para todas las preguntas. Los cambios negativos se pueden atribuir a cualquiera de las siguientes razones: 1) poco tiempo para medir cambios en la práctica, 2) algunas de las viviendas de los escolares entrevistados tienen malla de mosquitero en las ventanas, 3) durante la época de sequía el uso del mosquitero disminuye en los hogares debido a la baja abundancia o ausencia de mosquitos en la comunidad y 4) la intervención educativa, así como las encuestas se realizaron en época de sequía, aspecto que pudo influir en la respuesta de los escolares.

Este trabajo es el primero en su tipo realizado en la población escolar indígena de la región del río Caura y es de carácter exploratorio, por cuanto no se contó con una prueba previa a la aplicación del instrumento de evaluación CAP, ni un análisis del grado de dificultad de las preguntas. Estos aspectos pueden ser de interés incorporar para la aplicación futura del instrumento CAP y el análisis de resultados. Es importante resaltar que la intervención educativa y su evaluación se realizaron en lengua Ye'kwana y traducidas al castellano por los docentes interculturales bilingües, aspecto que limitó la interacción directa entre investigadores y estudiantes, y por ende la percepción de los primeros sobre el nivel de comprensión y cambios de conducta de los estudiantes con relación a la prevención y el control de la malaria.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La intervención educativa fue efectiva en cuanto al aumento en el conocimiento y los cambios positivos en las prácticas para la prevención y control

de la malaria. Con estos resultados es de esperar que la aplicación permanente del proyecto pedagógico de aula sobre la malaria (Bevilacqua *et al.*, 2012) en las escuelas comunitarias indígenas de la cuenca del río Caura (municipios Sucre y Cedeño), permitirá que los escolares egresados de educación primaria tengan un entendimiento adecuado de la malaria como enfermedad, en particular su ciclo de transmisión, sus causas y consecuencias para la salud individual, la familia, la comunidad y su área de influencia. De esta manera estarán en mejor capacidad de identificar, adaptar y practicar soluciones para la prevención y el control de la enfermedad en el hogar, dentro y fuera de su comunidad.

Considerando los resultados de este estudio se recomienda a las autoridades del Instituto de Salud Pública del estado Bolívar, de la Zona Educativa del estado Bolívar y de la Organización Indígena del Caura KUYUJANI, gestionar la incorporación del proyecto pedagógico de aula La Malaria al currículo de educación primaria, de modo que su implementación sea obligatorio en todas las escuelas comunitarias del pueblo Ye'kwana y Sanema en la cuenca del río Caura, así como en el centro poblado Maripa, capital del Municipio Sucre y sede de la demarcación sanitaria Maripa. La Organización KUYUJANI cuenta con coordinadores docentes interculturales bilingües entrenados en la aplicación del proyecto de aula sobre la malaria, que pueden liderar su instrumentación operativa con el apoyo de las autoridades de la Zona Educativa. Los agentes de salud comunitaria capacitados en la vigilancia epidemiológica de la malaria pueden monitorear el impacto de la estrategia educativa sobre los indicadores malariológicos locales con el acompañamiento del Programa de Malaria del Instituto de Salud Pública del estado Bolívar.

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Fundación Santa Fe de Bogotá, en el marco de la Iniciativa de Liderazgo para el Desarrollo del Campo de ECOSALUD y Enfermedades Transmitidas por Vectores en Latinoamérica. Recibió contribuciones en materiales educativos de River People Initiative

y utilizando mosquiteros tratados con insecticidas de la Fundación Rotaria (Mosquitero Project Grant GG14-11141). Los autores extienden su sincero agradecimiento a la Organización Indígena del Caura Kuyujani (Maidaleno Cortéz y Luis Tomedez, a los escolares participantes, docentes interculturales bilingües, agentes de salud comunitaria y demás miembros de las comunidades indígena participantes; a Jorge Altuve y Gladys Villarroel (Escuela de Educación-Universidad Central de Venezuela), a Mónica Jiménez y Gabriel Carrasquilla (Fundación Santa Fe de Bogotá), a Zenaida Muria y Eloisa Fuenmayor (ACOANA), Yasmin Rubio-Palis (Universidad Carabobo/IAE-MPPS), Stephen Baker y Henry Valero (Fundación Rotaria), así como a Silvana Cisneros y Tamia Souto (River People Initiative). Finalmente, queremos agradecer a los árbitros que contribuyeron a mejorar la versión final del manuscrito.

REFERENCIAS

- Alvarado B. E., Gómez E., Serra M., Carvajal R. & Carrasquilla G. (2006). Evaluación de una estrategia educativa en malaria aplicada en localidades rurales del Pacífico colombiano. *Biomédica*. **26**: 342-345.
- Bevilacqua M. & Ochoa J. G. (2001). Conservación de las últimas fronteras forestales de la Guayana venezolana: propuesta de lineamientos para la cuenca del río Caura. *Interciencia*. **26(10)**: 491-497.
- Bevilacqua M., Medina D. A., Cárdenas L., Rubio-Palis Y., Moreno J., Martínez A., et al. (2009). Orientaciones para fortalecer el programa de malaria en zonas remotas con población indígena en el Caura, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 53-71.
- Bevilacqua M., Cárdenas L. & Medina D. A. (2012). *Guía pedagógica del docente comunitario para la prevención y el control de la malaria en poblaciones indígenas de la cuenca del Río Caura, estado Bolívar*. Áreas de aprendizaje matemática, ciencias naturales y sociedad, de educación primaria. Serie de Publicaciones Educativas. ACOANA. Caracas, Venezuela.
- Bevilacqua M., Rubio-Palis Y., Cárdenas L. & Medina D. A. (2015). Malaria control in amerindian communities of Venezuela. Strengthening ecohealth practice throughout conservation science and capability approach. *EcoHealth*. **12(2)**: 253-266
- Colchester M., Silva N. M. & Tomedes R. (2004). *Protegiendo y fomentando el uso consuetudinario de los recursos biológicos: Alto Caura, Venezuela*. Reino Unido: Forest People Programme, Universidad Nacional Experimental de Guayama y Organización Indígena de la Cuenca del Caura.
- Gabaldón A. (1983). Malaria eradication in Venezuela: doctrine, practice, and achievements after twenty years. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 203-211.
- Machado-Allison A., Chernoff B. & Bevilacqua M. (2003). *Introduction to the Caura River Basin, Bolivar State, Venezuela*. In: Chernoff B., Machado-Allison A., Riseng K. J., Montaubault J. R. (editors). A Biological Assesment of the Caura River Basin, Bolivar State, Venezuela. Bulletin of Biological Assesment N° 20. Washington, DC: Conservation International.
- Medina D. M., Bevilacqua M., Cárdenas L., Morales L. G., Rubio-Palis Y., Martínez A., et al. (2011). Mapa de riesgo de transmisión de malaria en la cuenca del río Caura, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 129-144.
- MPPS (2012). Boletín Epidemiológico. Semana Epidemiológica N° 52, del 23 al 29 de diciembre de 2012. Disponible en: http://www.bvs.gob.ve/boletin_epidemiologico/2012/Boletin_52_2012.pdf [consultado en 01 de febrero de 2015].
- MPPS (2014). Boletín Integral de Salud Ambiental. Semana Epidemiológica N° 50, del 07 al 13 de diciembre 2014.
- MPPS (2015). Boletín Integral de Salud Ambiental. Semana Epidemiológica N° 9, del 01 al 07 de marzo 2015.
- Moreno J. E., Rubio-Palis Y., Páez E., Pérez E. & Sánchez V. (2007). 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.* **21**: 339-349.

- OPS (2008). *Encuesta sobre conocimientos, actitudes y prácticas (CAP): Una herramienta para el abordaje intercultural de la malaria*. Programa regional de acción y demostración de alternativas sostenibles para el control del vector de la malaria sin uso de DDT en América Central y México: programa regional salud de los pueblos indígenas de Las Américas. Organización Panamericana de la Salud. Panamá.
- Pérez I. L. & Delgado M. (2012). Un juego de cartas durante los recreos escolares mejora los hábitos alimentarios en adolescentes. *Nutrición Hospitalaria*. **27(6)**: 2055-2065.
- Rodríguez A. D., Penilla R. P., Henry-Rodríguez M., Hemingway J., Betanzos A. F. & Hernández-Avila J. E. (2003). Knowledge and beliefs about malaria transmission and practices for vector control in Southern Mexico. *Salud Públ. Méx.* **45(2)**: 110-116.
- Rosales J., Bevilacqua M., Díaz W., Pérez R., Rivas D. & Caura S. (2003). *Riparian vegetation communities of the Caura River*. In: Chernoff B., Machado-Allison A., Riseng K. J., Montaubault J. R. (editores), A biological assesment of the Caura River Basin, Bolivar State, Venezuela. Bulletin of Biological Assesment N° 20. Washington, DC: Conservation International.
- Sánchez L., Herrera G. & Ospina J. (2014). Intervención educativa para modificación de conocimientos, actitudes y prácticas sobre nutrición en Boyacá, Colombia. *Rev Cuid.* **5(2)**: 851-858. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15649/cuidarte.v5i2.127> [consultado el 10 febrero de 2015]
- Sandoval de Mora M. (1997). El problema de la malaria en Venezuela y en el Estado Bolívar. *Gaceta Médica de Caracas*. **105**: 22-23.
- Suárez-Mutis M. C., Rodríguez J., Massara C. & Torres V. (2011). Effect of a participatory educational program on primary school teacher's knowledge of malaria. *Rev. Saúde Públ.* **45(5)**: 1-8.
- Soto R. J., Fernández E. A. & Avila G. A. (1995). Evaluación de un programa educativo sobre dengue y *Aedes aegypti* focalizado en niños de escuela primaria. *Rev. Med. Hondur.* **63(1)**: 14-18.

Recibido el 16/06/2015
Aceptado el 28/12/2015

Persistencia en la competencia vectorial de *Aedes albopictus* de Venezuela a una cepa asiática dengue 2

Vector competence persistence of Venezuelan Aedes albopictus for an Asian dengue-2 strain

Yda Méndez¹, Marifel Carrozza¹, Darjaniva Molina P. de Fernández², Karen Flores³ & Flor Herrera^{1*}

RESUMEN

En Venezuela, existen poblaciones de *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) de diferente origen geográfico y estructura genética que difieren en la competencia vectorial para el virus dengue. Debido a que, recientemente, se reportó la presencia de *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*), es importante también conocer la competencia vectorial de esta especie para prever el riesgo epidemiológico el cual conlleva a su propagación. Se determinó la persistencia en la competencia vectorial de *Ae. albopictus* de Maracay, Venezuela a una cepa asiática dengue 2. Las especies de mosquitos *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* fueron alimentadas con una suspensión sangre-virus dengue 2 y luego de 20 días post-exposición viral se determinó la presencia del virus por el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las diferentes partes de los insectos: abdomen (infección), patas/alas (diseminación) y cabeza (transmisión). Los resultados muestran que la cepa *Ae. aegypti* es más susceptible a la infección del abdomen (60 %) que la cepa de *Ae. albopictus* (37,5%); sin embargo, sólo en *Ae. albopictus* se encontró el virus presente en las patas/alas (100%) y cabezas (33%). La cepa de *Ae. albopictus* estudiada podría ser más competente para la transmisión del virus dengue asiático que la de *Ae. aegypti*. Este hallazgo es de gran importancia epidemiológica, ya que se demuestra que este vector aún no estando en su continente de origen, puede seguir siendo un vector eficiente y con el tiempo adecuarse a las cepas virales propias.

Palabras clave: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, competencia vectorial, virus dengue asiático, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El dengue es la fiebre viral hemorrágica más extensamente distribuida y una de las arbovirosis más importantes desde el punto de vista epidemiológico a nivel mundial. La enfermedad es producida por

SUMMARY

In Venezuela, there are populations of *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) with different geographic origins and genetic structure that differ in vector competence for dengue virus. Since recently, the presence of *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) was reported, it is also important to know the vector competence of this species to predict the epidemiological risk which would bring its spread. The objective was to determine the vector competence persistence of *Ae. albopictus* from Maracay, Venezuela for an Asian dengue-2 strain. The two species of mosquitoes were fed with a blood-dengue 2 virus suspension and after 20 days post-exposure to virus, the presence of the virus was determined by the polymerase chain reaction assay in different parts of the insect: abdomen (infection), legs/wings (spread) and head (transmission). The results show that the strain *Ae. aegypti* is more susceptible to infection in the abdomen (60 %) that the strain of *Ae. albopictus* (37.5%); however, only in *Ae. albopictus* this virus was found in the legs /wings (100%) and heads (33%). The studied strain of *Ae. albopictus* may be more competent vector in the transmission of the dengue 2 virus than *Ae. aegypti*. This finding is of great epidemiological importance as this shows that even this mosquito not being in its continent of origin, it can still be an efficient vector and eventually become adapted to the native viral strains.

Key words: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, vectorial competence, Asian dengue virus, Venezuela.

uno de los 4 serotipos del virus dengue, un flavivirus transmitido al humano por la picada del mosquito *Aedes* (OPS/OMS, 2010).

No existe una vacuna licenciada contra el dengue y la transmisión de la enfermedad se controla

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC). Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

² Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA). Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" (MPPS). Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

³ Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental (MPPS). Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

*Autora de correspondencia: flormhq@gmail.com

previniendo la reproducción del vector (OPS/OMS, 2010). El virus dengue se ha detectado en mosquitos *Ae. aegypti* capturados en diferentes localidades de Venezuela lo cual los involucra en el ciclo de transmisión del virus en nuestro país (Urdaneta *et al.*, 2005). *Ae. albopictus* también está presente en Venezuela, aunque todavía no se ha detectado ninguno infectado por virus dengue (Navarro *et al.*, 2009; Martiradonna *et al.*, 2013).

Venezuela es un país hiperendémico para el dengue debido a la existencia de importantes poblaciones del vector *Ae. aegypti* todos los meses del año y a la circulación simultánea de los 4 serotipos del virus dengue (Camacho-García *et al.*, 2012) si a este escenario, se le suma la propagación de *Ae. albopictus*, la situación del dengue podría empeorar en los próximos años, por lo cual resulta prioritario estudiar si este vector asiático mantiene su capacidad de transmitir el virus dengue en territorio venezolano.

La dinámica de transmisión del virus dengue está asociada a factores propios del insecto vector, como la competencia vectorial (susceptibilidad del vector a la infección, replicación, diseminación y transmisión del virus dengue) y a factores inherentes al virus; como el serotipo y genotipo viral (Black *et al.*, 2002; Tabachnik, 2013). Además, esta dinámica se ve influenciada por factores extrínsecos y de conducta del mosquito como: la temperatura y humedad del medio ambiente, título de virus en el humano y hábitos de alimentación, los cuales influyen sobre características relacionadas con el vector como la longevidad, el período de incubación extrínseco y la abundancia del vector (Tabachnik, 2013; Gurugama *et al.*, 2010).

La hembra adulta del mosquito *Aedes* es hematófaga (a diferencia del macho que se alimenta solo del néctar de las flores) y por ende es el género de este mosquito involucrado en el ciclo biológico del virus dengue. El ciclo de transmisión del virus dengue se inicia cuando el mosquito *Aedes* se alimenta de una persona infectada con el virus en el período virémico. Si el mosquito es competente el virus se desarrolla y replica en primer lugar en el intestino medio del insecto y luego de superar algunas barreras a nivel local se disemina a través de la hemolinfa a otros órganos entre ellos las glándulas salivales del mosquito, donde el virus también debe

replicarse. Finalmente, el virus se transmite a través de la saliva infectada del mosquito, cuando éste pica a un hospedador vertebrado sano (Black *et al.*, 2002; Tabachnik, 2013). La competencia vectorial de los mosquitos es un fenómeno muy complejo que resultaría de la interacción de un gran número de genes del insecto, de interacciones genotipo x genotipo entre virus dengue y la especie de vector y diversos factores ambientales, en su gran mayoría desconocidos, que funcionan de forma coordinada (Tabachnik, 2013). Ahora bien, en condiciones ambientales controladas en el laboratorio, la competencia vectorial para arbovirus se ha asociado principalmente con barreras anatómicas, las cuales, entre otras, incluyen; la barrera de infección del intestino medio (MIB, midgut infection barrier), la barrera de escape del intestino medio (MEB, midgut escape barrier), la barrera de infección de las glándulas salivales (SIB, salivary gland infection barrier) y la barrera de escape de las glándulas salivales (SEB, salivary gland escape barrier) (Beerntsen *et al.* 2000). Se piensa que cada barrera para el virus dengue en *Aedes* está controlada por genes o grupos de genes específicos para cada una de estas. Actualmente, la base molecular de todas estas barreras se desconoce, pero se sabe que la respuesta inmune del insecto juega un rol principal en las mismas (Zhang *et al.*, 2010).

Investigaciones recientes indican que la competencia vectorial está influenciada también por interacciones genotipo x genotipo entre virus dengue y la especie de vector. Tales interacciones deben sumarse con los efectos causados de forma independiente por genes del vector y genes del virus (Lambrechts, 2011).

La competencia vectorial para la transmisión del dengue varía entre especies diferentes del mosquito *Aedes* (Black *et al.*, 2002). En Venezuela, se ha reportado que cuatro poblaciones diferentes de *Ae. aegypti*, con distintos origen geográfico y estructura genética, difieren en la competencia vectorial para el virus dengue 1 (Pernalet *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2006). Estudios similares no se han realizado todavía en *Ae. albopictus* ya que su presencia en Venezuela es muy reciente. Investigar si la cepa de *Ae. albopictus* de Maracay mantiene su competencia en la transmisión del virus dengue 2, es importante para entender el riesgo que implicaría su coexistencia con *Ae. aegypti* en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y cría de los mosquitos

Las larvas de *Ae. albopictus* fueron capturadas en la Universidad Central de Venezuela en Maracay - Edo. Aragua por personal capacitado y criadas en condiciones controladas de laboratorio (28°C y 80% de humedad relativa) hasta obtener la generación F4 en el Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios del CEEESA. Aproximadamente, 250 hembras adultas (6 días de emergidas) fueron trasladadas al insectario del BIOMED para los experimentos de infección.

De la misma manera, un aproximado de 250 hembras *Ae. aegypti* (F4) de 6 días de emergidas (cepa La Pedrera de Maracay-Edo. Aragua) fueron criadas en la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental del Estado Aragua y posteriormente transportadas al insectario del BIOMED para los experimentos de infección.

Infección y mantenimiento de los mosquitos

La infección experimental de las distintas poblaciones se logró mediante el método de alimentación artificial de papel parafinado (Rutledge *et al.*, 1964). El alimento consistió en una suspensión de glóbulos rojos humanos (previamente lavados con PBS) mezclados con suero fetal bovino (Pernalet *et al.*, 2009) y una suspensión de virus dengue 2 cepa 16681 con un título viral de $1,6 \times 10^5$ UFP/ml. Las dos cepas del vector fueron expuestas, de manera independiente, a la misma ingesta viral ($5,3 \times 10^4$ UFP/ml) y condiciones de ensayo. El virus utilizado en este estudio corresponde a la cepa de virus dengue 2 (16681), la cual fue aislada en Tailandia (paciente fallecido por SCD) y desde entonces ha pasado por diferentes líneas de células, gentilmente donado por el Laboratorio Regional para el Diagnóstico del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV). La suspensión sangre-virus fue introducida en los mosquitos de forma oral; método de elección cuando se estudia la susceptibilidad a la infección por el virus dengue en distintas partes del mosquito, ya que el mismo permite evaluar las barreras más importantes del insecto.

El método consiste de un alimentador artificial de vidrio, conectado a un baño térmico de

circulación mantenido a 37°C. La superficie de papel parafinado, a través de la cual el mosquito se alimenta, es atravesada por el aparato bucal del mosquito (probóscide) al momento de la alimentación (Rutledge *et al.*, 1964). La frecuencia con que las hembras de *Aedes* se alimentan con sangre está determinada por la necesidad de ingerir sangre para completar su ciclo gonotrófico (tiempo durante el cual los ovarios maduran hasta convertirse en folículos desarrollados completamente).

Durante la alimentación experimental, las hembras adultas de *Aedes* fueron expuestas (*ad libitum*) por el período de 1 hora a la ingesta sanguínea, tiempo suficiente para que todas las hembras se alimenten de la suspensión sanguínea hasta quedar repletas (Vazeille *et al.*, 2001). Luego se separaron las repletas (hembras engurgitadas: N° de mosquitos alimentados / N° de mosquitos expuestos) a otra jaula y se dejaron por 20 días post-exposición bajo condiciones controladas de laboratorio (28°C, 80% de humedad relativa) mantenidas con solución de sacarosa al 10%. El período de incubación del virus dengue en el vector (desde que es ingerido hasta que el virus se desarrolla en las glándulas salivales) es de aproximadamente 7-14 días, luego de este período el mosquito competente es capaz de transmitir el virus a un nuevo hospedador susceptible (Zhang *et al.*, 2010). Se dejaron 20 días post-exposición viral para asegurar la replicación del virus en las glándulas salivales de los vectores competentes (Zhang *et al.*, 2010).

Diseción y extracción del ARN total de los diferentes segmentos de mosquitos

Pasado el período de incubación extrínseca (20 días post-alimentación), se determinó el porcentaje de hembras sobrevivientes (N° de mosquitos sobrevivientes / N° de mosquitos alimentados), se sacrificaron y se formaron grupos (de 10 individuos c/u) con las diferentes especies: de *Ae. albopictus* silvestre (8 grupos en total) y de *Ae. aegypti* silvestre (10 grupos). Los mosquitos fueron divididos en abdomen, (sitio donde se determinó el porcentaje de susceptibilidad a la infección oral por el virus dengue: N° de mosquitos infectados / N° de mosquitos expuestos), patas y alas (donde se determinó el porcentaje de diseminación viral: N° de mosquitos con infección en las patas/alas / N° de mosquitos infectados), y cabeza (el porcentaje de

transmisión, debido a la localización en esta parte de las glándulas salivales: N° de mosquitos con infección en la cabeza/ N° de mosquitos infectados).

Los distintos segmentos de los mosquitos (grupos de 10 individuos) fueron distribuidos en tubos de 1 ml previamente identificados por grupo y cepa, para luego aislar el ARN total de las diferentes partes del mosquito.

La extracción del ARN total de los mosquitos infectados con el virus dengue se realizó mediante una adaptación del método del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Urdaneta *et al.*, 2005). Las muestras se procesaron por segmento (abdomen, cabeza, patas y alas) y una cepa de mosquito a la vez, para evitar la contaminación. Las muestras de ARN fueron cuantificadas a 260 y 280nm. Seguidamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar la calidad del mismo. Las muestras de ARN se ajustaron a 200 µg/mL.

Diagnóstico del virus dengue 2 por Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La presencia del virus se determinó mediante el método de RT-PCR en un sólo paso para diagnóstico de dengue (Harris *et al.*, 1998), la cual fue confirmada por el método tradicional de RT-PCR anidada (Lanciotti *et al.*, 1992), utilizando el kit Access de Promega. La banda de dengue 2 es de 119 pb.

Análisis estadístico

Fueron aplicadas las pruebas Chi-cuadrado de independencia, mediante el programa Open Epi (Estadísticas epidemiológicas de código abierto para Salud Pública), Versión 3.03 (Dean *et al.*, 2015).

RESULTADOS

En la Tabla I, se muestra el número de individuos alimentados y sobrevivientes por grupo. La cepa de *Ae. albopictus* mostró un porcentaje significativamente menor de alimentación (44%) que la de *Ae. aegypti* (80%) bajo las mismas condiciones ($P < 10^{-6}$). Con respecto a los individuos sobrevivientes luego de los 20 días post-infección, la cepa de *Ae. albopictus* mostró el mayor porcentaje de sobrevivientes (72%) que la cepa de *Ae. aegypti* (60%) y el resultado fue significativo ($P= 0,013$).

Otro dato importante observado cualitativamente, es que la cepa de *Ae. aegypti* coloca muchos más huevos que la cepa de *Ae. albopictus*. Este resultado se menciona, aunque no estaba programado en la metodología, porque está directamente relacionado con la densidad del vector, parámetro que a su vez influye en la capacidad vectorial de estas especies.

En la Fig. 1 se muestra el resultado de la amplificación del virus dengue 2 a partir de muestras de abdomen de diferentes cepas de mosquitos *Aedes*. En la Fig. 1A, se observan los resultados para la cepa

Tabla I. Porcentaje de hembras *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* alimentadas y sobrevivientes por grupo. Un total de 250 hembras de cada especie fueron expuestas a alimentación artificial y mantenidas en cautiverio 20 días post-exposición.

Especie	Hembras Engurgitadas (%)	<i>P</i> *	Hembras Sobrevivientes (%)	<i>P</i> *
<i>Ae. aegypti</i>	80	<10-6	60	0,013
<i>Ae. albopictus</i>	44		72	

*Prueba de independencia Chi Cuadrado

Tabla II. Porcentaje de Infección, Diseminación y Transmisión del virus cepa asiática dengue 2, en mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.

Especie	*Infección (%)	Diseminación (%)	Transmisión (%)
<i>Ae. aegypti</i>	60	0	0
<i>Ae. albopictus</i>	37,5	100	33

*Prueba de independencia Chi Cuadrado: $P = 0,317$

de *Ae. albopictus* infectados experimentalmente con el virus. Los grupos 4, 7 y 8 dieron un producto de amplificación de tamaño esperado (119 pb) y por lo tanto resultaron positivos a la infección con el arbovirus. Asimismo, en la Fig. 1B, se observa que 6 grupos de los 10 examinados de la cepa de *Ae. aegypti*, amplificaron la banda esperada para el virus dengue 2.

La diseminación del virus dengue se determinó por detección cualitativa del ARN viral en las muestras de patas/alas de los mosquitos expuestos al virus (20 dpe). En la Fig. 2A, se observan los resultados para la cepa de *Ae. albopictus*. Los grupos 4, 7 y 8 presentaron la banda esperada (119 pb), lo cual indicó la diseminación del arbovirus a las patas/alas. La cepa de *Ae. aegypti* no mostró ninguna amplificación; por lo tanto, el virus no se diseminó en esta población de mosquitos.

La competencia vectorial para la transmisión oral del virus dengue en las dos especies de *Aedes* se comparó determinando la presencia del ARN viral en las muestras de las cabezas de los insectos

por localizarse en este sitio sus glándulas salivales. En la Fig. 3A puede apreciarse que sólo un grupo de los tres infectados de la población de *Ae. albopictus*, amplificó el producto del tamaño esperado (119 pb) y por lo tanto, resultó positivo a la transmisión del virus. La cepa *Ae. aegypti* resultó negativa a la amplificación del virus en la cabeza (Fig. 3B).

En la Tabla II pueden observarse los porcentajes de infección, diseminación y transmisión del virus dengue 2 en las dos cepas estudiadas. En *Ae. aegypti* la infección fue mayor (60%) a los 20 días, que en *Ae. albopictus* (37,5%) aunque el resultado no fue estadísticamente significativo ($P = 0,317$). Se observa también que sólo en los mosquitos infectados de *Ae. albopictus*, el virus fue capaz de diseminarse (100%) y llegar hasta las glándulas salivales (33%).

DISCUSIÓN

Los resultados, estadísticamente muy fuertes, mostraron que la cepa de mosquitos *Ae. albopictus* se alimentó mucho menos, en las condiciones experimentales, que la de *Ae. aegypti*.

Fig. 1. Amplificación del virus cepa asiática dengue 2 en muestras de abdomen de *Aedes* infectados con el virus, *Ae. albopictus* (A); *Ae. aegypti* (B); (+) control positivo; (-) control negativo de la RT-PCR; (M) marcador de peso molecular de 100 pb.

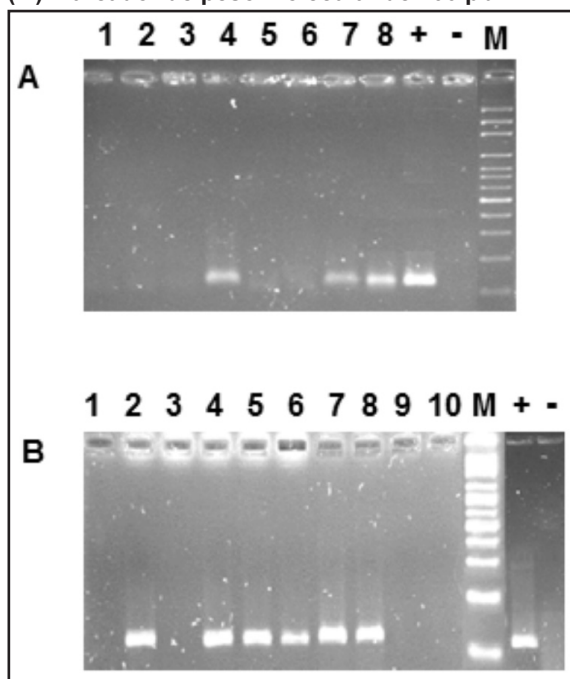


Fig. 2. Amplificación del virus cepa asiática dengue 2 en muestras de patas/alas de los mosquitos *Aedes* expuestos a la infección viral. *Ae. albopictus* (A); *Ae. aegypti* (B); (+) control positivo; (-) control negativo; (M) marcador de peso molecular de 100 pb.

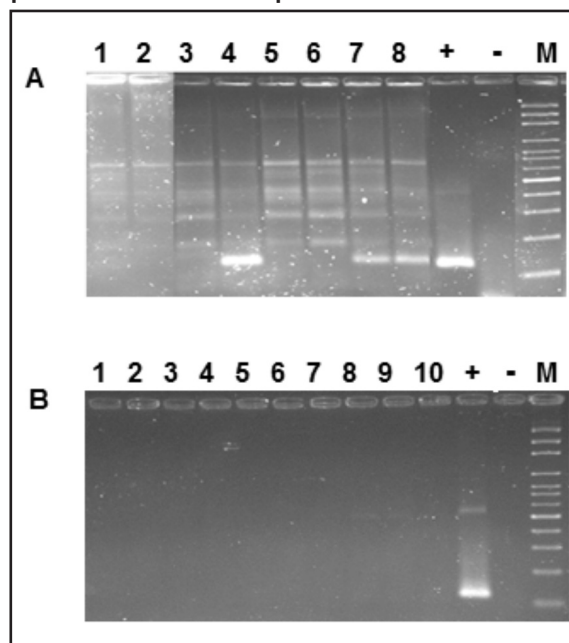
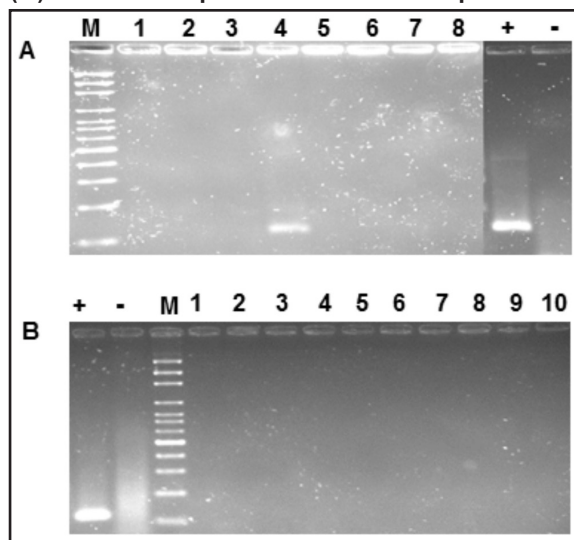


Fig. 3. Amplificación del virus cepa asiática dengue 2 en muestras de cabeza de mosquitos *Aedes* infectados con el virus. *Ae. albopictus* (A); *Ae. aegypti* (B); (+) control positivo; (-) control negativo; (M) marcador de peso molecular de 100 pb.



Estas condiciones simulan más un ambiente urbano que uno rural: la densidad de los mosquitos fue alta y debieron alimentarse de una misma fuente de suministro. Por lo tanto, la mayor actividad hematófaga de la cepa *Ae. aegypti* podría explicarse porque estos mosquitos están más adaptados a un ambiente urbano que la cepa de *Ae. albopictus*. Esto, posiblemente, provocó competencia entre los mosquitos de una misma cepa, por el alimento y en estas condiciones la cepa de *Ae. aegypti* se alimenta mejor. Un trabajo que le da apoyo a esta hipótesis, realizado en diferentes hábitats de una provincia de China, ha reportado que *Ae. albopictus*, adaptado a las áreas urbanas, presentó un desarrollo de larvas y pupas más rápido y una mayor tasa de sobrevivencia de larvas a adultos que los *Ae. albopictus* encontrados en las áreas semiurbanas y rurales (Li *et al.*, 2014).

Otro dato que podría explicarse por ser *Ae. aegypti* más urbano que *Ae. albopictus* es el mayor número de huevos que coloca con respecto a *Ae. albopictus*. Este resultado debería ser estudiado exhaustivamente con ambas especies de mosquitos en condiciones naturales. Otros autores han trabajado también en ambientes urbanos (peri e intradomiciliarios) y han concluido que *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* pueden colocar huevos en ambos hábitats pero *Ae. aegypti* está mejor adaptado y coloca más huevos que *Ae. albopictus* (Serpa *et al.*, 2013).

Un meta-análisis demostró que los arbovirus reducen la sobrevivencia de los vectores y la magnitud de este efecto depende, entre otros factores, de cuales vectores y virus estén interactuando así como del tipo de infección (Lambrechts & Scott, 2009). En el presente trabajo, los mosquitos *Ae. albopictus* alimentados tuvieron una mayor sobrevivencia, estadísticamente significativa, que *Ae. aegypti* lo cual sugiere que la demanda metabólica para la reproducción viral afecta más la longevidad de este último mosquito. Esto es muy importante porque la mayor longevidad aumenta la probabilidad de transmitir enfermedades (Lambrechts & Scott, 2009). De tal manera que la relación entre los virus y sus insectos vectores no es necesariamente benigna y el grado de afectación en los mosquitos producirá diferencias en competencia vectorial entre diferentes especies y entre diferentes poblaciones de una misma especie (Lambrechts & Scott, 2009; Tabachnik, 2013).

Los resultados, aunque no estadísticamente significativos, mostraron que la tasa de infección por el virus dengue fue mayor en *Ae. aegypti* (60% vs 37,5%); sin embargo, la tasa de diseminación y de trasmisión del virus fue 100% y 33% en *Ae. albopictus* mientras que en *Ae. aegypti* fue 0% para ambas tasas. Estos resultados sugieren fuertemente que la cepa *Ae. albopictus* de Venezuela sigue siendo muy eficiente en la transmisión de cepas de virus de su mismo origen. Esto significa que, debido a la alta probabilidad de que simultáneamente circulen estos vectores y los virus, la transmisión sucederá con resultados inesperados (si es que no ya se están dando). Si a esto se le añade que *Ae. albopictus* tiene una gran capacidad en la transmisión transovárica (Gratz, 2004) y en adaptación a diferentes ambientes (Lambrechts *et al.*, 2010), la diseminación y mantenimiento del virus podría ocurrir en las diferentes localidades tal como ha sucedido en otros países (Lambrechts *et al.*, 2010). Además, los resultados de infección experimental sugieren que la cepa *Ae. albopictus* de Venezuela es más competente, si bien con una asociación débil, para la transmisión viral que la cepa *Ae. aegypti*.

La menor competencia vectorial de *Ae. aegypti* por el virus dengue con respecto a *Ae. albopictus* es un resultado sorprendente ya que *Ae. aegypti* es el principal vector del dengue en nuestro país; sin embargo, esto podría explicarse si se considera que dicho mosquito, como ya se mencionó

anteriormente, coloca un número muchísimo mayor de huevos que *Ae. albopictus* lo cual aumentaría su densidad, factor muy importante en las epidemias de dengue. Es decir, la competencia vectorial de *Aedes aegypti* sería menor que la del otro vector pero al colocar más huevos que *Ae. albopictus* compensaría esta debilidad y pasaría a tener una mayor capacidad vectorial.

En este trabajo surgen una serie de interrogantes que tendrían que ser aclaradas. En consecuencia, habría que realizar un estudio con un tamaño de muestra mucho mayor para detectar *Ae. aegypti* infectados con el virus dengue; asimismo, hacer estudios con otras cepas virales (especialmente autóctonas) para ver si este comportamiento es sólo de la cepa dengue 2 asiática e igualmente utilizar cepas de mosquitos de generaciones menores para ver si estas características son o no propias de mosquitos desarrollados en colonia.

Obviamente, las infecciones experimentales no duplican exactamente las interacciones complejas que ocurren entre los mosquitos, los virus y el ambiente en la naturaleza. No obstante, estos resultados son un alerta para las autoridades de salud pública, con el fin que tomen en cuenta las características particulares del nuevo vector *Ae. albopictus* para el diseño de las estrategias de control vectorial del dengue.

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

A los investigadores Guillermo Comach y Daría Camacho por donar gentilmente la cepa de virus dengue 2 (16681) utilizada en la infección experimental de los mosquitos, a la Dra. Irma Ágrela y al Dr. Carlos Espino por su valiosa orientación en los experimentos de infección y en el análisis estadístico respectivamente. Se agradece también al personal del CEEESA y de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental por el suministro de los vectores. Este trabajo fue financiado por el Ministerio del Poder Popular Para la Ciencia, Tecnología e Innovación, a través del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología; Proyecto Misión Ciencia N° 2008000911-1.

REFERENCIAS

- Beerntsen B., James A. & Christensen B. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 115-137.
- Black W., Bennett K., Gorrochotegui-Escalante N., Barillas-Mury C., Fernández-Salas I., *et al.* (2002). Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res.* **33**: 379-388.
- Camacho-García D., Ferrer E., Tenorio A., Franco L. & Comach G. (2012). Epidemiología molecular de los virus Dengue. *Bol. Mal. Salud Amb.* **52**: 1-13.
- Dean A. G., Sullivan K. M. & Soe M. M. (2015). *OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*. Documento en línea: http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm. (Consultado: 2015, Diciembre 26).
- Gratz N. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* **18**: 215-227.
- Gurugama P., Garg P., Perera J., Wijewickrama A. & Seneviratne S. (2010). Dengue viral infections. *Indians J. Dermatol.* **55**: 68-78.
- Harris E., Roberts G., Smith L., Selle J., Kramer L., Valle S., *et al.* (1998). Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2634-2639.
- Herrera F., Urdaneta L., Rivero J., Zoghbi N., Ruiz J., Carrasquel G., *et al.* (2006). Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**: 625-633.
- Lambrechts L. (2011). Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm?. *Trends Parasitol.* **27**: 111-114.
- Lambrechts L. & Scott T. W. (2009). Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proc. Biol. Sci.* **276**: 1369-1378.

- Lambrechts L., Scott T. W. & Gubler D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**: 1-9.
- Lanciotti R. S., Calisher CH., Gubler D. J., Chang G. J. & Vorndam A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 545-551.
- Li Y., Kamara F., Zhou G., Puthiyakunnon S., Li Ch., Liu Y., *et al.* (2014). Urbanization increases *Aedes albopictus* larval habitats and accelerates mosquito development and survivorship. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e3301. doi:10.1371/journal.pntd.0003301.
- Martiradonna G., Silva J., Molina M., Salcedo L., Sánchez V., Amaya W., *et al.* (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus*: (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en Maracay-Aragua, Venezuela, aumento en su distribución geográfica. *Bol. Mal. Salud Amb.* **53**: 196-197.
- Navarro J-C., Zorrilla A. & Moncada N. (2009). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) en Venezuela. Importancia como vector de Dengue y acciones a desarrollar. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 161-166.
- OPS/OMS (2010). *Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. WHO Press. La Paz, Bolivia.
- Pernalet M., Fernández Z., Rivera M., Zarzour J., Ruiz J., Rivero J., *et al.* (2009). Susceptibilidad a la infección oral por virus DEN-1 en poblaciones de *Aedes aegypti* de Venezuela. *Salus online* **12**: 45-57.
- Rutledge L., Ward R. & Gould D. (1964). Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq. News* **24**: 407-419.
- Serpa L., Monteiro G., de Lima A., Voltolini J., de Brito M., Barbosa G., *et al.* (2013). Study of the distribution and abundance of the eggs of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* according to the habitat and meteorological variables, municipality of São Sebastião, São Paulo State, Brazil. *Parasites Vectors* **6**: 321-332.
- Tabachnick W. (2013). Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in Mosquito Arbovirus Transmission Competence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10**: 249-277.
- Urdaneta L., Herrera F., Pernalet M., Normig Z., Rubio-Palis Y., Barrios R., *et al.* (2005). Detection of dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua State, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect. Genet. Evol.* **5**: 177-184.
- Vazeille M., Mousson L., Rakatoarivony I., Villeret R., Rodhain F., Duchemin J., *et al.* (2001). Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 491-497.
- Zhang M., Zheng X., Wu Y., Gan M., He A., Li Z., *et al.* (2010). Quantitative Analysis of Replication and Tropisms of Dengue Virus Type 2 in *Aedes albopictus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**: 700-707.

Recibido el 24/03/2015
Aceptado el 28/12/2015

Estado de la resistencia a insecticidas organosintéticos de *Aedes aegypti* de Coro, estado Falcon, Venezuela

Status of resistance to organo-synthetic insecticides by an Aedes aegypti strain from Coro, Falcon state, Venezuela

Danny Bastidas Beltrán¹, Luisa Figueroa Acosta¹, Enrique Pérez Pinto¹ & Darjaniva Molina Picón de Fernández^{1*}

RESUMEN

Aedes aegypti es una de las especies más estudiadas en salud pública por ser vector primario en el ser humano del virus dengue, fiebre amarilla, chikungunya y zika. Se evaluó la respuesta a los insecticidas organofosforados malatión, fenitrotión, pirimifos-metil al carbamato propoxur y al piretroide lambdacialotrina en una cepa de campo denominada Coro, conformada por un pool de material (inmaduro) colectado en barriadas con alta casuística de dengue ubicadas en municipio Miranda, estado Falcón, Venezuela; en comparación con la cepa susceptible Rockefeller. Se realizaron los bioensayos en botellas tratadas con insecticidas, según el método del CDC e igualmente se identificaron los mecanismos de resistencia in vitro a través de pruebas bioquímicas. La cepa evaluada resultó resistente a malatión (45 min), fenitrotión (75 min) pirimifos-metil (75 min) con respecto a la cepa susceptible con 30, 45 y 45 min. respectivamente, con porcentajes de mortalidad en el tiempo umbral de 89,2% malatión; 55,7% fenitrotión; 56,6%, pirimifos-metil. Se encontró susceptibilidad al carbamato propoxur y al piretroide lambdacialotrina. En cuanto a las pruebas bioquímicas se encontraron valores elevados para esterasas alfa (α) y beta (β) con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) al comparar con la cepa susceptible. La acetilcolinesterasa inhibida (Achei) a pesar de encontrar diferencias significativas con la cepa Rockefeller los valores están por debajo de la misma. La resistencia de la cepa Coro a los insecticidas organofosforados parece asociarse con el incremento de las esterasas alfa (α) y beta (β). Los resultados obtenidos representan un aporte valioso para monitorear la resistencia de *Ae. aegypti* a nivel local dentro de un programa de manejo integrado de vectores.

Palabras clave: esterasas, acetilcolinesterasa, organofosforados, resistencia a insecticidas.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos constituyen uno de los grupos de insectos de mayor importancia médica

SUMMARY

Aedes aegypti is one of the most studied species in public health as the primary vector in humans the dengue, chikungunya, zika virus and yellow fever. Response to organophosphorus insecticides malathion, fenitrothion, methyl-pirimiphos and carbamate propoxur was evaluated and the pyrethroid lambda-field strain called Coro, made up of a pool of material (immature) collected in neighborhoods with high casuistry of dengue Coro located in Miranda municipality, Falcón state, Venezuela; compared with the susceptible Rockefeller. Bioassays in insecticide-treated bottles were performed according to the method of the CDC and also the mechanisms of resistance in vitro were identified by biochemical tests. The resistant strain was evaluated to malathion (45 min), fenitrothion (75 min) methyl-pirimiphos (75 min) compared to the susceptible strain with 30, 45 and 45 min respectively, with mortality rates of 89.2% malathion, 55.7% fenitrothion 56.6%, pirimiphos-methyl. Susceptibility to propoxur carbamate and pyrethroid lambda was found. As for the high values for biochemical tests esterases alpha (α) and beta (β) with statistically significant differences ($P < 0.05$) compared with the susceptible strain were found. Inhibited acetylcholinesterase (Achei) despite significant differences with the Rockefeller strain values are below the same acetylcholinesterase. Falcon resistance to organophosphate insecticides strain appears to be associated with increased alpha esterases (α) and beta (β). The results represent a valuable contribution to monitor the resistance of *Ae. aegypti* locally within a program of integrated vector management.

Key words: esterases, acetylcholinesterase, organophosphate, insecticide resistance.

por su acción como vectores biológicos de numerosas enfermedades. La especie *Aedes aegypti* perteneciente al orden Díptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae, se distribuye en la mayor parte

¹ Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" (MPPS). Maracay, estado Aragua. Venezuela.

*Autora de correspondencia: darja2410@gmail.com

de las áreas tropicales o subtropicales del planeta, comprendidas entre los 45° de latitud norte y los 35° de latitud sur, en las zonas isotermales intermedias a los 20°C (Salvatella, 2005). Es el vector primario en el ser humano de los flavivirus dengue (DEN), fiebre amarilla (VFA), alfavirus Chikungunya (CHIKV) y Zika (Centro de Control de Enfermedades, CDC, 2010; Organización Mundial de la Salud, OMS, 2013; 2014). En Venezuela, desde la primera epidemia de dengue en 1989-1990, se han reportado cientos de miles de casos hasta la fecha. De hecho entre el 2009-2013 se reportaron más de 335 mil casos, de los cuales en el estado Falcón se reportaron más de 11.500 (Ministerio del Poder Popular para la Salud, MPPS, 2010; 2012 y 2013). Debido a las cifras señaladas y considerando el carácter endémico del dengue en nuestro país y la ausencia de una vacuna contra este virus, las estrategias de control de *Ae. aegypti* están basadas en el manejo integrado del vector, que implica el saneamiento ambiental, la educación sanitaria, la participación social y el control químico vectorial a través del uso de insecticidas durante las epidemias (Rodríguez, 2002). El malatión y otros organofosforados han sido usados como adulticidas en tratamiento espacial con el fin de reducir las densidades del vector. También se ha usado temefos granulado en recipientes de agua doméstica para control de hábitats larvales, y los insecticidas piretroides como adulticidas, sobre todo en casos de emergencia (Georghiouet *et al.*, 1987; Gratz., 1991). Sin embargo el uso de la herramienta química en el control de *Ae. aegypti*, ha traído como consecuencia la selección de poblaciones del vector resistentes a insecticidas. En Cuba se ha reportado alta resistencia en larvas de *Ae. aegypti* a temefos y a fenitron la cual está asociada con las enzimas esterasas y oxidasas (Bisset *et al.*, 2004); para el estado adulto, se observó resistencia a malatión, fenitrotion y propoxur (Rodríguez *et al.*, 2004). En México los niveles elevados de esterasas sugieren resistencia a organofosforados, carbamatos y algunos insecticidas piretroides (Flores *et al.*, 2007). Así mismo Pérez *et al.*, (2009), estudiaron la resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Ae. aegypti* de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela, donde evaluaron los insecticidas organofosforados: malatión, pirimifosmetil, y temefos y el carbamato propoxur, encontrando resistencia al malatión en los tres municipios evaluados y susceptibilidad a metilpirimifos, temefos y al carbamato propoxur.

El presente estudio consiste en analizar la resistencia de *Ae. aegypti* a los diferentes insecticidas haciendo uso de herramientas biológicas y bioquímicas, a fin de ofrecer información valiosa desde el punto de vista químico, que pueda incorporarse en los programas de manejo integrado del vector.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

La muestra para los bioensayos estuvo comprendida por mosquitos adultos de *Ae. aegypti* obtenidos a partir de material inmaduro (larvas y pupas) recolectado de recipientes en los que el agua se conservó por períodos superiores a una semana, sin ser renovada; tales recipientes incluyen: tanques sin tapa, pipotes, latas, floreros y otros semejantes, ubicados en los solares y preferiblemente en lugares sombreados de los cementerios y algunos jardines de las diferentes localidades, seleccionadas por ser los primeros lugares en reportar la presencia de *Ae. aegypti*. Para ello se aplicaron los métodos sugeridos por la Organización Mundial de la Salud, utilizando cucharones, goteros y succionadores (OMS, 1993). El material fue trasladado al Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) IAE “Dr. Arnoldo Gabaldón” para su desarrollo.

Aedes aegypti cepas de campo: De las localidades Pantano arriba, Pantano abajo, Los Orumos, Urb. Los Médanos, Barrio La Cañada, Barrio Zumurucuaire y Chimpire.

Ae. aegypti cepa Rockefeller: Cepa susceptible suministrada por el Centro de Control de enfermedades (CDC), San Juan de Puerto Rico.

Insecticidas

Fueron evaluados los insecticidas: organofosforados: malatión (96%), fenitrotión (95%) y pirimifos-metil (89,8%); carbamato: propoxur (99,3%) y el piretroide lambdacialotrina (70%), en presentación grado técnico, sin valor comercial, los mismos fueron suministrados por Insecticidas Internacionales Compañía Anónima (INICA), Cagua, estado Aragua, Venezuela.

Pruebas Biológicas

Se realizaron siguiendo el método de las botellas tratadas con insecticidas, del CDC (Brogdon & McAllister, 1998). Los mosquitos adultos *Ae. aegypti* fueron expuestos a botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 mL, tratadas con soluciones cetónicas de insecticidas, las cuales se usaron como cámaras de prueba para detectar la resistencia o susceptibilidad a los insecticidas en mosquitos adultos. Estas fueron preparadas en el Laboratorio de Evaluación de Insecticidas del CEEESA, IAE “Dr. Arnoldo Gabaldon” siguiendo metodología estandarizada por Figueroa *et al.*, 2006 y evaluadas a la dosis diagnósticas y el límite o umbral de resistencia, obtenidos en la cepa Rockefeller en el laboratorio, así tenemos que: malatión (100 µg en 30 minutos), fenitrotión (100 µg en 45 minutos), pirimifosmetil (100 µg en 45 minutos), lambdacialotrina (6,25 µg en 30 minutos), y propoxur (6,25 µg en 15 minutos), (Molina de Fernández *et al.*, 2013).

Los ensayos se realizaron a temperaturas aproximadas de 23°C±2 y humedad relativa de 55%±5. Fueron expuestos aproximadamente 15±5 mosquitos adultos hembras por botella y se evaluaron cuatro repeticiones por cada concentración de insecticida y dos repeticiones como grupo control. Los ensayos fueron replicados tres veces el mismo día de ejecución del bioensayo durante el tiempo en el que se logró el 100% de mortalidad. De esta manera se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición y de acuerdo a la mortalidad del control se planteó corregir con la fórmula de Abbot (1925). Se relacionaron las variables tiempo-mortalidad. Para ello se graficaron los registros de porcentajes de mortalidad en el eje de las abscisas (X) y el tiempo en el eje de las ordenadas (Y), haciendo uso del Programa Excel 97-2003. Dicho análisis arrojó la línea gráfica de la tasa de mortalidad de la cepa a cada insecticida. Estas fueron graficadas en el mismo plano junto con la línea de base de susceptibilidad del respectivo insecticida; correspondiente a las dosis diagnósticas y límite umbral de resistencia. Mortalidad menor al 80%, se catalogó como resistente, entre 80% y 97% como población en vigilancia y 98% o más como susceptible. (IRAC, 2011; WHO, 1998). Cuando en el grupo control se registró una mortalidad entre 5 y 20% se aplicó la fórmula de Abbott (1925) para su corrección.

Criterio de mortalidad

Mosquitos “muertos” son los que presentan ausencia de movimiento, derribo o incapacidad para caminar. Mosquitos inmovilizados que se deslizan por la curvatura de la botella al rotarla, deben ser clasificados como “muertos”. El porcentaje de mosquitos muertos en el tiempo diagnóstico (mosquitos muertos/total de mosquitos en el ensayo) es el valor más importante en el gráfico (CDC, 2015).

Pruebas Bioquímicas

Para determinar los mecanismos bioquímicos asociados con la pérdida de susceptibilidad a insecticidas, se realizaron pruebas “*in vitro*” de mecanismos enzimáticos involucrados en los sistemas de desintoxicación en la resistencia metabólica a insecticidas. (Brogdon *et al.*, 1989; Figueroa *et al.*, 2006).

Cada mosquito fue triturado en 50 µl de una solución tampón de fosfato de sodio (0,05 M; pH 7,5) y diluido a 0,5 mL del mismo tampón. Se tomaron alícuotas de 50 µL de cada muestra que fueron colocadas en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se evaluaron cuatro enzimas diferentes que confieren resistencia a insecticidas; esterasas alfa (α); esterasas beta (β); acetilcolinesterasa (AChe); acetilcolinesterasa insensible (ACHei).

Los sustratos utilizados en cada ensayo incluyen α y β-naftil acetato para las esterasas, el yoduro de acetiltiocolina se usó para medir la concentración de la acetilcolinesterasa sensible, para la acetilcolinesterasa insensible se añadió el insecticida carbamato propoxur a la muestra. La absorbancia fue medida en un lector de ELISA (Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas), Multiskan Plus de Fisher Scientific, empleando filtros de 620 nm para las (α) y (β) esterasas y filtro de 405 nm para las AChE y AChEi. A los datos obtenidos se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($P < 0,05$) a través del programa Statistix versión 8.0 (Sokal & Rolf, 1980).

Identificación de esterasas por electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), se utiliza mayormente para la separación de proteínas cargadas, por migración en un campo

eléctrico. En el presente trabajo la electroforesis se realizó siguiendo el método de García-Segua *et al.*, 2002, para lo cual se prepararon las muestras en una proporción de 1:1; 10 μ L de homogenato con 10 μ L de amortiguador de carga, un total de 20 μ L. Luego se preparó el gel tampón colocándolo en la placa y esperando la polimerización del mismo. Seguidamente se preparó el gel de corrida, añadiéndolo a la placa nuevamente, colocando el peine separador. Una vez ocurrida la polimerización se retiró el peine, y el gel del soporte. Se llenó la cámara con amortiguador de corrida, se colocó el gel dentro de esta y se colocaron las muestras en cada pocillo correspondiente; la corrida a 150 voltios se llevó a cabo entre 1 hora ó 1 hora y 20 minutos, aproximadamente. Posteriormente, se sacó el gel y se colocó en un recipiente que contenía 50 ml de substrato, se incubó por 20 minutos luego se añadió el colorante Fast Blue por 5 minutos; se enjuagó y se procedió a sumergirlo en solución fijadora 50 ml por 20 minutos; luego se procedió a secar a 80°C por 1 hora y 45 minutos respectivamente, se retiraron y cuantificaron las bandas. Para la identificación de esterases, se determinó la razón de movilidad (Rf), dividiendo la distancia recorrida de cada una de las bandas de la muestra, entre la distancia recorrida por el indicador, y se buscó identificar las esterases A4 y B2, que han sido reportadas como mecanismo de resistencia en otras especies de importancia médica.

RESULTADOS

Pruebas Biológicas

En el tratamiento control no se encontró mortalidad superior al 5%.

En las Fig. 1, 2 y 3 se presentan los resultados al evaluar los insecticidas organofosforados malatión, fenitrotion y pirimifos-metil a una concentración de 100 μ g/mL, cada uno. La cepa Coro presentó el 100% de mortalidad a los 45 min para malatión (Fig. 1); a los 75 min para fenitrotión (Fig. 2) y pirimifos-metil (Fig. 3), con porcentajes de mortalidad en el tiempo umbral de 89,2% malation; 55,7% fenitrotion; 56,6%, pirimifos-metil, con respecto a la cepa susceptible que tuvo tiempos de 30, 45 y 45 min. respectivamente. Dichos datos indican que la cepa Coro es resistente a todos los insecticidas organofosforados evaluados.

En la Fig. 4 se presentan los resultados al evaluar el insecticida piretroide lambdacialotrina a una concentración de 6,25 μ g/mL. La cepa Coro, presentó el 100% de mortalidad a los 30 min., no superando el umbral de resistencia por lo que es susceptible a dicho insecticida.

En la Fig. 5 se presentan los resultados al evaluar el insecticida carbamato propoxur a una concentración de 6,25 μ g/mL, la cepa Coro, alcanzó el 100% de mortalidad a los 15 min., no superando el umbral de resistencia por lo que esta cepa resultó susceptible a este insecticida.

Pruebas Bioquímicas

En la Tabla I se presenta un resumen de los resultados de los mecanismos de resistencia a insecticidas “*in vitro*”, representados por la media de las densidades ópticas (DO) y sus valores de desviación estándar para cada una de las determinaciones realizadas. Se muestran los valores de la cepa referencial susceptible Rockefeller y la cepa Coro encontrando que los niveles de esterases (α) y (β) fueron elevados y el análisis de Kruskal Wallis demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) al comparar con la cepa susceptible. En cuanto a la ACheI a pesar de encontrar diferencias estadísticamente significativas con la cepa Rockefeller, los valores están por debajo de la misma.

Identificación de esterases por electroforésis

En la Fig. 6 se presentan los patrones electroforéticos para las esterases (α) y (β), donde se pueden observar 3 patrones esterases, con 1, 2 y 3 bandas, en total 3 patrones de bandas distintas, con valores de Rf entre 0,2 a 0,7; con variable intensidad del color de las bandas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la cepa *Ae. aegypti* Coro presentó resistencia a los insecticidas organofosforados: malatión, fenitrotión y pirimifos-metil, evidenciándose una marcada diferencia en las líneas gráficas obtenidas al comparar con las de la cepa susceptible Rockefeller. Se demostró que la resistencia a los organofosforados estudiados pudiera ser por el incremento de los niveles de esterases como

Fig. 1. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Ae. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y una cepa de campo de Coro, estado Falcón expuestos al insecticida organofosforado malation a una concentración de 100 µg/mL por botella.

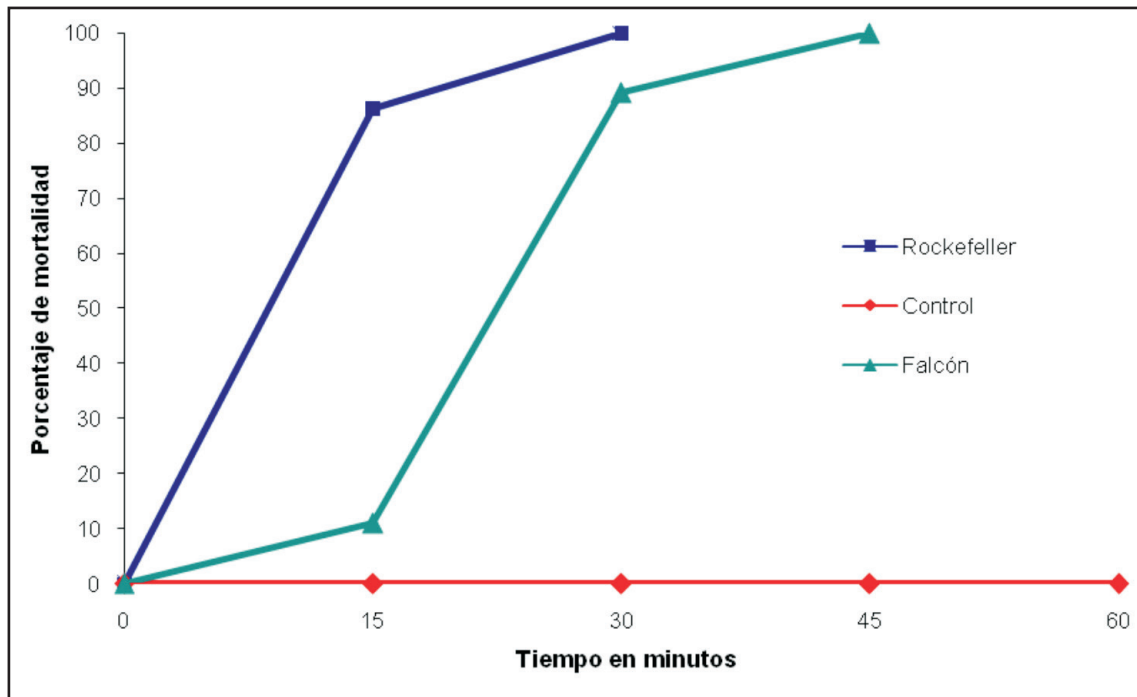


Fig. 2. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Ae. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y una cepa de campo de Coro, estado Falcón expuestos al insecticida organofosforado fenitrotión a una concentración de 100 µg/mL por botella.

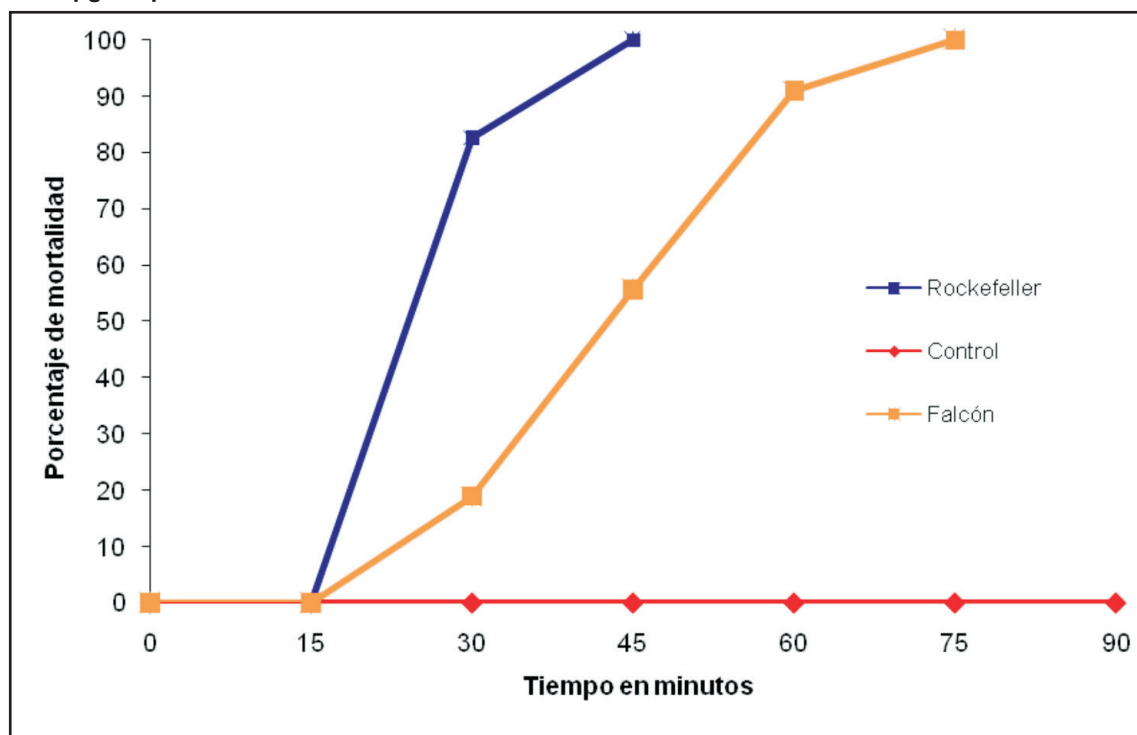


Fig. 3. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Ae. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y una cepa de campo de Coro, estado Falcón, expuestos al insecticida organofosforado metil-pirimifos a una concentración de 100 µg/mL por botella.

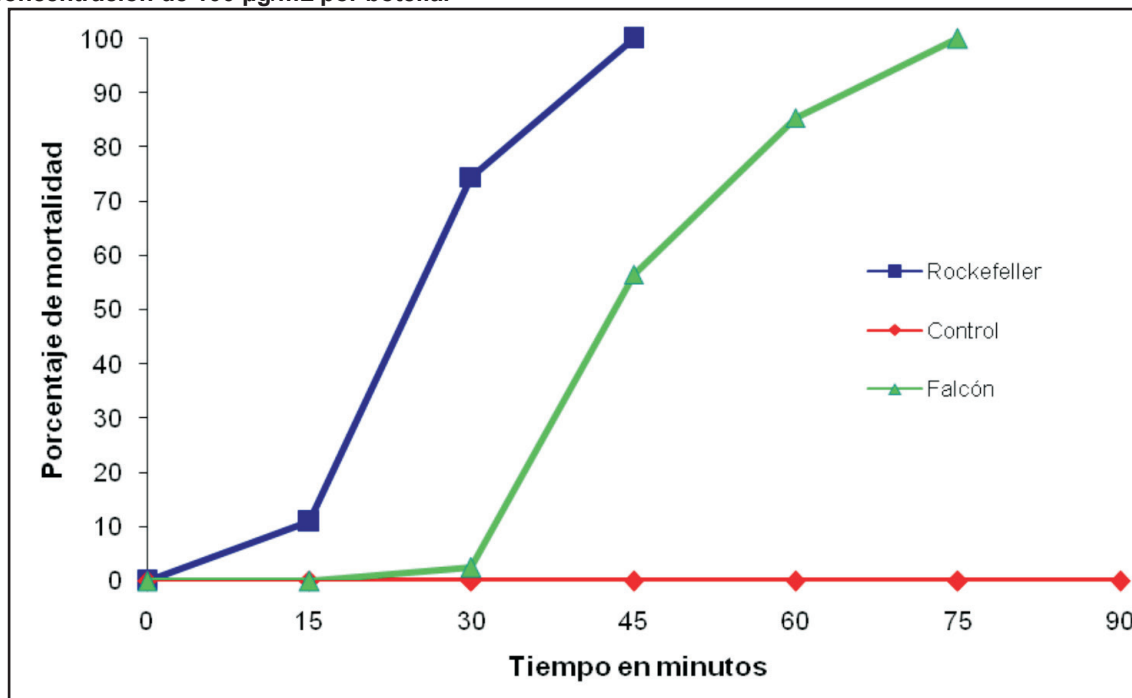


Fig. 4. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Ae. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y una cepa de campo de Coro, estado Falcón, expuestos al insecticida piretroide lambdacialotrina a una concentración de 6,25 µg/mL por botella.

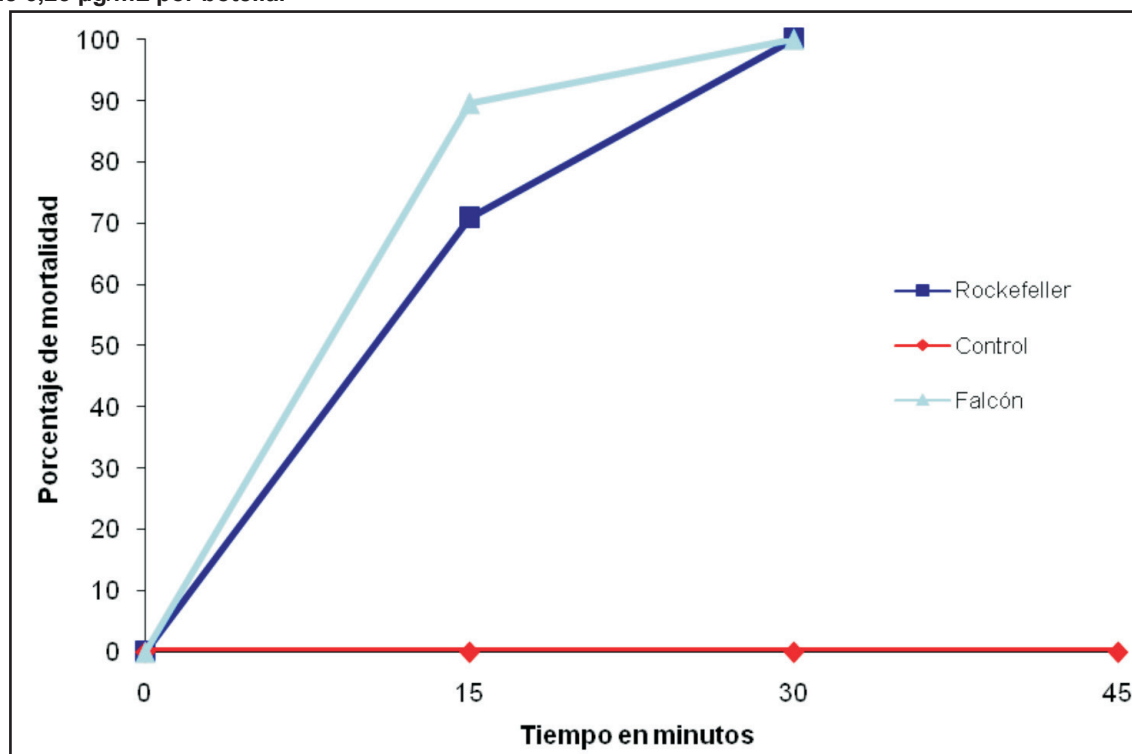


Fig. 5. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Ae. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y una cepa de campo de Coro, estado Falcón, expuestos al insecticida carbamato propoxur a una concentración de 6,25 µg/mL por botella.

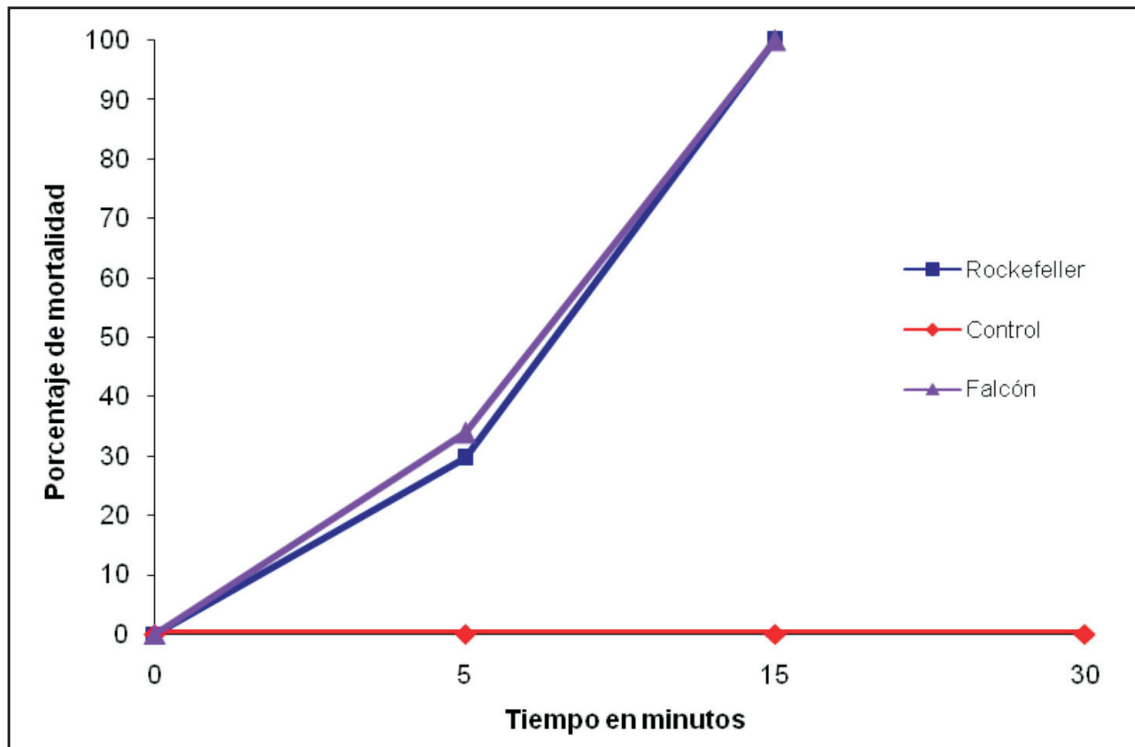


Fig. 6. Patrones electroforéticos en *Ae. aegypti* de Coro (hembras y machos), Municipio Miranda, Estado Falcón.

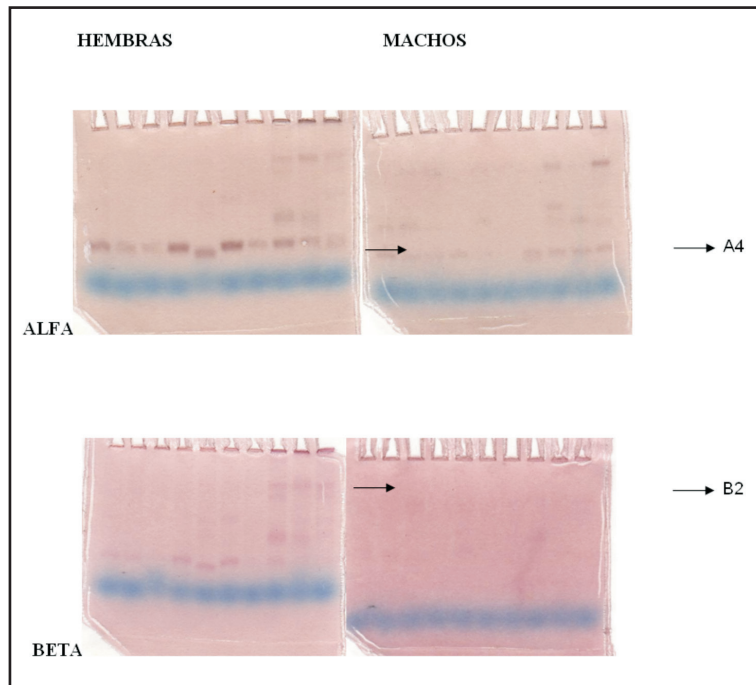


Tabla I. Mecanismos de resistencia “in vitro” (media y desviación estándar) de *Ae. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y una cepa de campo de Coro Falcón.

Cepas	Mecanismos Enzimáticos Evaluados		
	Esterasas alfa (α)	Esterasas beta (β)	AChei Insensible
Rockefeller	1,163 +/- 0,080	1,063 +/- 0,087	0,110 +/-0,026
Falcón	1,641 +/- 0,091	1,634 +/- 0,111	0,107 +/-0,104

mecanismo de resistencia metabólica dado por los altos valores obtenidos en las pruebas bioquímicas de las esterasas (α) y (β) (Flores *et al.*, 2007). La AChei no está involucrada como mecanismo de resistencia a los insecticidas organofosforados a pesar de encontrar diferencias significativas ($P < 0,05$), al comparar con la cepa Rockefeller, se encontraron valores inferiores de los presentados por esta cepa. Diversos estudios han demostrado resistencia a los insecticidas organofosforados en *Anopheles* (Figuroa *et al.*, 2006) *Culex* (Reyes & Mark, 2000) en *Ae. aegypti* (Georghiou *et al.*, 1987). En 1960 se reportaron los primeros casos de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos en *Ae. aegypti* (Fox *et al.*, 1961), reportaron una cepa en Puerto Rico resistente a malation y diazinon. La capacidad de resistir al malation se asoció con la destoxicación mediada por enzimas de actividad específica: carboxilesterasa lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Molina de Fernández *et al.* (1995), así mismo reportaron que en cepas de *Ae. aegypti* de cinco estados venezolanos (Aragua, Barinas, Lara, Miranda y Táchira), se demostró que los organofosforados malation y fenitrotión continuaban siendo eficaces para el control en zonas urbanas a pesar de haber sido ampliamente usados para el control de *Ae. aegypti* en Venezuela.

El origen de esta resistencia metabólica pudiera ser el resultado de las medidas de control aplicadas al vector *Ae. aegypti* en el municipio Miranda, Coro, estado Falcón las cuales incluyen el uso de malation y fenitrotión (fenitrotión) para el control de adultos según datos suministrados por la Dirección de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria de la Gobernación Bolivariana del Estado Falcón. Esta presión con el malation pudo haber producido genes de resistencia que favorece resistencia cruzada a fenitrotión y pirimifos-metil, lo cual se evidenció en dicho estudio. Se encontró susceptibilidad al insecticida piretroide lambdacialotrina y al carbamato

propoxur. Estudios de evaluación de la resistencia a insecticidas han encontrado susceptibilidad a insecticidas piretroides tal es el caso de Vargas *et al.* (2006) y Bisset *et al.* (2009) por lo que este insecticida al igual que el carbamato propoxur son buenos candidatos para emplear en las estrategias de control de este vector. Más recientemente, Molina de Fernández *et al.* (2013), publicaron un estudio donde evaluaron mosquitos provenientes de zonas urbanas con alta casuística de dengue de los estados: Amazonas, Aragua, Bolívar, Lara, Mérida y Zulia, para determinar el status de susceptibilidad en este vector al malation, en comparación con la cepa susceptible Rockefeller. Los resultados de los bioensayos mostraron que existe susceptibilidad a malation, lo cual fue confirmado por pruebas bioquímicas. Los datos encontrados en este estudio, sugieren que una estrategia de manejo de insecticidas es necesaria para implementar y mantener a largo plazo la susceptibilidad, tratando de revertir la resistencia encontrada en Coro estado Falcón.

Los análisis por medio de electroforésis, revelaron diversas combinaciones de bandas, tanto de esterasas alfa como de esterasas beta. No obstante, se encontró que estaba presente una banda correspondiente con la llamada B2 ($Rf=0,2$) y otra banda correspondiente con la llamada A4 ($Rf=0,7$), ambas están reportadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados, en varias especies de mosquitos vectores de enfermedades. Estos datos son el primer reporte de zimogramas de esterasas(α) y (β), en *Ae. aegypti* de Coro, Falcón, y son un aporte valioso, que pone a disposición una herramienta bioquímica, para confirmar resistencia a insecticidas por bioensayos biológicos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Rodríguez *et al.*, 2000, quienes encontraron que todas las cepas evaluadas de *Ae. aegypti* de varios países de Latino América que incluyen a Venezuela, presentaban una banda fuertemente teñida de una

esterasa A4, que estuvo asociada con la resistencia a insecticidas organofosforados, usados en los programas de control para esta especie. Así mismo Bisset *et al.*, 2001, reporta la misma banda de esterasa A4, para cepas de *Ae. aegypti*, provenientes de varios estados de Venezuela y una cepa de Santiago de Cuba. También Vargas *et al.*, 2006, identificaron la esterasa B2 en *Ae. aegypti* de Perú asociada con resistencia a organofosforados, encontrada en bioensayos “in vivo”. Finalmente Rodríguez *et al.*, 2007, en ocho países de Latino América incluyendo Venezuela, en geles de poliacrilamida, detectaron la presencia de una banda fuertemente teñida de esterasa A4, asociada con resistencia al organofosforado temefos en larvas de *Ae. aegypti*, y con resistencia en adultos a piretroides.

Sobre la base de los resultados obtenidos, *Ae. aegypti* de Coro, Falcón, muestra resistencia a los organofosforados malatión, fenitrotión y pirimifos metil y susceptibilidad al piretroide lambda-cialotrina y al carbamato propoxur, por lo que se recomienda establecer estrategias de control, utilizando el piretroide y/o el carbamato en esquemas de rotación, alternando con insecticidas que posean diferentes mecanismos de detoxificación, aplicando estrategias para el control focal de *Ae. aegypti*.

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a: los árbitros que permitieron mejorar el trabajo, la Dirección de Investigación del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” (IAE), a través de la Directora Encargada Dra. María Naranjo, por su valiosa gestión en el apoyo logístico; al personal del Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) adscrito al IAE, especialmente al personal de Entomología y Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios. Este trabajo fue financiado por el IAE, Ministerio del Poder Popular Para la Salud y Ministerio del Poder Popular Para Ciencia, Tecnología e Innovación, a través del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT); Proyecto Misión Ciencia N° 2008000911-1.

REFERENCIAS

- Abbott W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- Bisset J., Rodríguez M., Fernández D. & Pérez O. (2004). Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Rev. Cubana Med. Trop.* **56**: 61-6.
- Bisset J., Rodríguez M., San Martín J., Romero J. & Montoya R. (2009). Evaluación de la Resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* del Salvador. *Rev. Panam. Salud Pública.* **26**: 229-234.
- Bisset J., Rodríguez M., Molina D., Díaz C. & Soca A. (2001). Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev. Cubana Med. Trop.* **53**: 37-43.
- Brogdon W., Beach R., Stewart J. & Castanaza L. (1989). Análisis por ensayo de microplacas de la distribución de la resistencia de *Anopheles albimanus* a organofosforados y carbamatos en Guatemala. *Bol. San. Panam.* **106**: 139-147.
- Brogdon W. & McAllister J. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time mortality determinations in glass bottles. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **14**: 159-154.
- Centro de Control de Enfermedades (CDC). (2010). *Hoja de datos sobre el dengue*. Documento en línea: <http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/HojaDatos.htm> (Consultado: 2014 Junio 25).
- National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2015). *Evaluating mosquitoes for insecticide resistance: Ensinovia Web*. Disponible en: <http://www.cdc.gov/malaria> (Consultado: 2015 Diciembre 13).
- Figueroa Acosta L. E., Marín Álvarez M., Pérez Pinto E. & Molina de Fernández D. (2006). Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en

- una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Bol. Mal. Salud Amb.* **46**: 39-47.
- Flores A., Salomon J., Fernandez I., Ponce G., Loaiza M., Lozano S., *et al.* (2007). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Quintana Roo, southern Mexico. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **22**: 672-677.
- Fox I. & García-Mola I. (1961). Multi-resistant *Aedes aegypti* in Puerto Rico and Virgin islands. *Science.* **233**: 6.
- García-Segua J., Gavilanes J., Martínez A., Montero F., Oñaderra M. & Vivanco F. (2002). *Técnicas instrumentales de análisis bioquímica*. España: Síntesis, SA.
- Georghiou G. P., Wirth M., Tran H., Saume F. & Knudsen A. B. (1987). Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J. Med. Entomol.* **24**: 290-294.
- Gratz N. G. (1991). Emergency Control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **7**: 353-365.
- Ministerio del Poder Popular Para la Salud. (MPPS). (2010). Boletín Epidemiológico Semanal, año 59, semana epidemiológica N° 52. Documento en línea: <http://www.mpps.gob.ve>. (Consultado: 2014, Junio 25).
- Ministerio del Poder Popular Para la Salud. (MPPS). (2012). Boletín Epidemiológico Semanal, año 61, semana epidemiológica N° 52. Documento en línea: <http://www.mpps.gob.ve>. (Consultado: 2014, Junio 25).
- Ministerio del Poder Popular Para la Salud. (MPPS). (2013). Boletín Epidemiológico Semanal, año 62, semana epidemiológica N° 52. Documento en línea: <http://www.mpps.gob.ve>. (Consultado: 2014, Junio 25).
- Molina de Fernández D., Bisset J., Rodríguez M., González J., Salas O., Barazarte H. & Salcedo A. (1995). Estudio de la susceptibilidad a insecticidas organofosforados y piretroides en cepas de *Aedes aegypti* (Linn.) de cinco estados de Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35**: 85-90.
- Molina de Fernández D., Bastidas D. & Figueroa Acosta L. E. (2013). Malation vs. *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **53**: 46-55.
- OMS (1993). *Técnicas entomológicas de campo para la lucha antipalúdica, parte I*. Guía del alumno. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. pp.:9-77.
- OMS (2013). *Fiebre Amarilla*. Nota informativa N° 100. Documento en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/es/> (Consultado: 2014, Junio 26).
- OMS (2014). *Dengue y dengue hemorrágico*. Nota descriptiva N° 117. Documento en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/> (Consultado: 2014, Junio 26).
- OMS (2014). *Chikungunya*. Nota descriptiva N° 327. Documento en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/> (Consultado: 2014, Junio 26).
- Pérez E. & Molina de Fernández D. (2009). Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 143-150.
- Reyes M. & Mark L. (2000). Resistencia del mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) a insecticidas en el estado Zulia, Venezuela. *Rev. Científica, FCV-LUZ.* **10**: 441-447.
- Rodríguez M., Bisset J., Fernández D. & Pérez O. (2004). Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Rev. Cubana Med. Trop.* **56**: 54-60.
- Rodríguez R. (2002). Estrategias para el control de dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Rev. Cubana Med. Trop.* **54**: 189-201.

- Rodríguez M., Bisset J. & Fernández D. (2007). Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **23**: 420-429.
- Rodríguez M., Bisset J., Molina D. & Soca A. (2000). Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after it is in *Aedes aegypti* control programs. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **16**: 324-330.
- Salvatella A. R. (2005). *Aedes aegypti* (Linneaus, 1972) (Diptera: Culicidae), el vector del dengue y la fiebre amarilla. Documento en línea: <http://www.higiene.edu.uy/dengue.htm>.(Consultado: 2013, Junio 20).
- Robert R. Sokal & F. James Rohlf (1979). *Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Primera edición española. Ediciones H. Blumes Rosario, 17- Madrid -5., 832p.
- Vargas F., Córdova O. & Alvarado A. (2006). Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* **23**: 259.

Recibido el 26/03/2015
Aceptado el 29/12/2015

Aislamiento de parásitos intestinales en la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) en Coro, estado Falcón, Venezuela

Isolation of intestinal parasites from American cockroach (Periplaneta americana) in Coro, Falcon state, Venezuela

Dalmiro Cazorla Perfetti^{1*}, Pedro Morales¹ & Patricia Navas²

RESUMEN

La cucaracha americana (*Periplaneta americana*) (Insecta: Dytioptera, Blattodea) posee una amplia distribución y adaptación a los ambientes humanos, y representa un problema de salud pública en áreas con un manejo sanitario inadecuado. El objetivo del presente estudio fue identificarlos taxones enteroparásitos en tegumento y tracto gastro intestinal de ninfas y adultos de *P. americana*. Entre abril y noviembre de 2014 fueron recolectados 149 ejemplares (102 imagos y 47 ninfas), en tres sitios de la ciudad de Coro, estado Falcón, Venezuela: mercado municipal (N=32), recinto universitario (N= 62) y Hospital Universitario "Alfredo Van Grieken" (HUAVG) (N=55). El análisis parasitológico reveló la presencia en el 97,99% (146/149) de las cucarachas muestreadas de 13 taxa enteroparasitarias, de las cuales siete son consideradas de interés sanitario (*Blastocystis* spp., *Leptomonas* spp., *Cyclospora* spp., *Cystoisospora* spp., *Lophomonas blattarum*, *Ascaris* spp. y *Enterobius vermicularis*). Las taxa más prevalentes fueron *Blastocystis* spp. (82,6%: 123/149) y *Leptomonas* spp. (70,5%: 105/149). Se discute las implicaciones de estos hallazgos en el contexto de la salud pública.

Palabras clave: *Periplaneta americana*, parásitos intestinales, identificación, forosis, Venezuela.

SUMMARY

The American cockroach (*Periplaneta americana*) (Insecta: Dytioptera, Blattodea) is a specie with a cosmopolitan distribution and well adapted to human environments. Cockroaches constitute a health hazard in areas with poor sanitary facilities. The aim of this study was to identify parasitic enteric taxa on tegument and intestinal tract of nymphs and adults of *P. americana*. Between April and November 2014, 149 specimens (102 adults and 47 nymphs) were collected in 3 municipal environments: an out market (N= 32), a university (N=62) and a hospital (HUAVG) (N=55), from Coro city, Falcon state, Venezuela. Parasitological analysis revealed the presence of 13 parasitic taxa in 97,99% (146/149) of cockroaches; seven of these parasites are considered to be for sanitary importance (*Blastocystis* spp., *Leptomonas* spp., *Cyclospora* spp., *Cystoisospora* spp., *Lophomonas blattarum*, *Ascaris* spp. and *Enterobius vermicularis*). *Blastocystis* spp. (82,6%: 123/149) and *Leptomonas* spp. (70,5%: 105/149) were the most prevalent taxa. The implications of these findings for public health were discussed.

Key words: *Periplaneta americana*, intestinal parasites, identification, phoresis, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el Orden Blattodea (Insecta: Dytioptera) lo integran además de las cucarachas, las termitas que son insectos eusociales y que eran clasificados anteriormente dentro del orden Isóptera (Inward *et al.*, 2007). En el globo terráqueo

existen actualmente alrededor de 4.500 especies de cucarachas, de las que solamente se encuentran asociadas o adaptadas a los ambientes transformados por el ser humano como 25 taxones (Beccaloni & Eggleton, 2011). Dentro de las cucarachas con hábitos peridomésticos y domésticos, destaca *Periplaneta americana* (Blattidae) denominada comúnmente

¹ Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (L.E.P.A.M.E.T.), Centro de Investigaciones Biomédicas (C.I.B.), Decanato de Investigaciones, Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" (UNEFM), Apdo. 7403, Coro 4101, Estado Falcón, Venezuela.

² Laboratorio de Investigación y Apoyo Docente (LIADSA), C.I.B., Decanato de Investigaciones, UNEFM, Coro, Estado Falcón, Venezuela.

* Autor de correspondencia: lutzomyia@hotmail.com/cdalmiro@gmail.com

cucaracha americana, la cual posee una distribución cosmopolita y es la cucaracha de mayor tamaño que invade los recintos humanos, especialmente en el área urbana (Rust *et al.*, 1991; Cochran, 1999; Graczyk *et al.*, 2005).

La avidez y atracción de las cucarachas sinantrópicas y particularmente *P. americana*, para alimentarse sobre una gran variedad de sustratos, incluyendo alimentos, basura y/o excretas, las ponen en contacto con microorganismos patógenos, tales como virus, hongos, bacterias, protozoos y/o helmintos, de manera tal que pueden actuar como transportadores mecánicos o foréticos de estos microorganismos patógenos, ya sea en su tegumento y/o intestinos (Ramírez-Pérez, 1989; Rust *et al.*, 1991; Lee, 1997; Cochran, 1999; Graczyk *et al.*, 2005). En este sentido, como todo insecto posee un exoesqueleto donde se encuentran los agentes patógenos, así mismo, en su anatomía interna las cucarachas tienen estructuras que contribuyen a transmitir elementos o factores contaminantes; en efecto, dentro de sus glándulas salivales, el tracto gastrointestinal y el sistema excretor pueden al menos permanecer viables numerosos tipos de organismos patógenos, que pueden diseminarse con sus vómitos, su saliva y sus excrementos (Lee, 1997; Cochran, 1999; Graczyk *et al.*, 2005). Adicionalmente, los excrementos y las cutículas de las cucarachas poseen una amplia variedad de alérgenos, de manera tal que muchas personas sensibles pueden potencialmente, dependiendo de la raza, condición socio-económica, exhibir respuestas alérgicas, incluyendo procesos asmáticos, erupciones dérmicas, congestión nasal, estornudos (Sarpong *et al.*, 1996; Bassirpour & Zoratti, 2014; Jeong *et al.*, 2015). También estos insectos pueden ocasionar en ciertos individuos episodios de ansiedad y miedo (entomofobia) (Lee, 1997).

Además de lo indicado, es importante destacar otros aspectos biológicos y ecológicos de *P. americana* que le permiten ser considerado como un eficiente transportador mecánico de patógenos en los ambientes sinantrópicos. Así, los adultos de esta especie de cucaracha doméstica exhiben la capacidad de soportar el ayuno por varias semanas, y poseen la habilidad de reproducirse durante todo el año en condiciones ambientales favorables (*e.g.*, elevada humedad y temperaturas cálidas); con tan solo una comida producen varias ootecas; así mismo, pueden cambiar de hábitats durante el día y la noche,

desplazándose dentro de los recintos (*e.g.*, ambientes domiciliarios, comerciales y hospitalarios) (Cochran, 1999).

Los parásitos intestinales de interés médico-zoonótico son muy frecuentes en los habitantes de la zona semiárida del estado Falcón, región nor-occidental de Venezuela (Cazorla *et al.*, 2006; 2012; 2014). Asimismo, en dichas regiones se han identificado estos entero-parásitos tanto en animales domésticos como en vegetales y frutas, incluyendo en las denominadas “comidas rápidas” (Tortolero *et al.*, 2008; Cazorla *et al.*, 2009; 2013a,b).

En la ciudad de Coro, enclavada en la zona semiárida del estado Falcón, en la región nor-occidental de Venezuela y sus alrededores, es un hecho vivencial y común observar con frecuencia numerosas poblaciones de cucarachas, especialmente de *P. americana*, y en particular en las cercanías de los mercados, expendios de comidas, viviendas, depósitos de basuras, incluyendo los de los hospitales y criaderos de animales en general y recintos educativos, con mayor énfasis donde el manejo sanitario es inapropiado.

A pesar de la presencia de abundantes poblaciones de cucarachas domésticas y de una prevalencia relativamente elevada de parásitos entéricos en esta zona del territorio nacional, no se tiene conocimiento de estudios documentados acerca de la importancia y relevancia de las cucarachas domésticas como posibles transportadores mecánicos de parásitos intestinales.

Por todo lo comentado, el presente trabajo tuvo como objetivo detectar la presencia de entero-parásitos, con mayor énfasis en los que potencialmente son patógenos para el humano y sus animales, en adultos y ninfas de *P. americana* recolectados en diversas áreas de la ciudad de Coro, estado Falcón, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio descriptivo transversal se realizó entre abril y noviembre de 2014, en la ciudad Coro (Lat.: 11°24'N; Long.: 69°40'O), capital del estado

Falcón, en la región semiárida septentrional de Venezuela. La zona posee características bioclimáticas correspondientes al monte espinoso tropical (MET), con clima semiárido, isotermas entre 27 y 28°C, escasas precipitaciones y suelos ostensiblemente erosionados (Ewel *et al.*, 1976).

Captura e identificación de cucarachas

Se realizaron capturas manuales y con trampas elaboradas *ad hoc* con envases plásticos (22 cm altura x 10 cm de anchura; cono: 10 cm x 3 cm) (Fig. 1) de ninfas y adultos de cucarachas (Blattodea), en tres sitios, como referencia para la búsqueda de posibles fuentes de contaminación de áreas comunitarias, educativas y nosocomiales de las cucarachas; para ello, se escogieron el mercado municipal, campus Borregales del Área Ciencias de la Salud, Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda” (UNEFM) y el Hospital Universitario “Alfredo Van Grieken” (HUAV). La distancia entre los sitios de colecta es de aproximadamente 1,5 kilómetros. Una vez capturadas, las cucarachas se transportaron inmediatamente dentro tubos de

ensayo estériles individuales para ser procesadas el mismo día en el Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (LEPAMET), UNEFM, Coro, Estado Falcón, Venezuela. Los insectos se inmovilizaron con frío (5-4°C) dentro de un refrigerador por 3-5 minutos, observándose bajo microscopio estereoscópico para su identificación específica de acuerdo a claves taxonómicas *ad hoc* (Ramírez Pérez, 1988; Beccaloni, 2007).

Aislamiento e identificación de parásitos intestinales

Una vez identificadas las cucarachas, para el aislamiento de los parásitos de la superficie del exoesqueleto se añadieron 2 ml de solución salina estéril (0,9%) dentro de los tubos que las contienen, y se agitaron durante 2-3 minutos en vórtex, y luego se removieron con pinzas estériles. El líquido resultante del lavado se dejó sedimentar en reposo a temperatura ambiente por 2-3 horas, y luego se centrifugó a 331 de fuerza centrífuga relativa (FCR) x g durante 3-5 minutos, procediéndose a recolectar el sedimento. Las muestras del sedimento se colocaron por duplicado sobre lámina portaobjeto, siendo observadas bajo microscopio de luz con la implementación de los métodos parasitológico directo (solución salina y lugol), y de tinción de Kinyoun (alcohol-ácido-resistente), para la búsqueda específica de ooquistes de coccidios intestinales, los cuales se midieron con ocular calibrado (Botero & Restrepo, 2012). Las cucarachas se consideraron positivas cuando se detectó, por lo menos, un estadio de protozoarios/cromista (quiste-ooquiste) o helmintos (huevo, larvas y/o adultos).

Para el aislamiento de los parásitos internos, las cucarachas se fijaron con alfileres en una placa de Petri rellena de parafina, y luego el tracto digestivo fue disectado asépticamente bajo microscopio estereoscópico. El tejido entérico se maceró bajo condiciones de asepsia, dentro de mortero conteniendo 2 ml de solución salina. Inmediatamente, el macerado se procesó parasitológicamente de manera similar como se describió anteriormente. Para la identificación de los taxones de parásitos intestinales de interés médico-zoonótico se siguió a Botero & Restrepo (2012); y para los propios de las cucarachas, los trabajos de Poinar (1977), Poinar & Thomas (1978), Kudo (1980) y Camino & González (2012).

Fig. 1. Trampa diseñada para la captura de cucarachas.



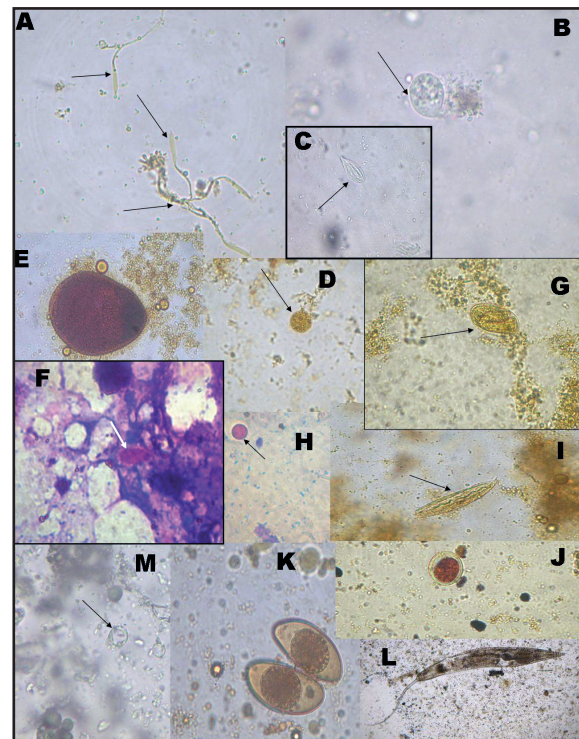
Análisis estadístico

La asociación univariante entre la presencia de entero-parásitos con el estadio de desarrollo de las cucarachas (imago, ninfas) y el sitio de captura se hizo mediante las pruebas de Ji cuadrado (χ^2) de Pearson y χ^2 de Mantel-Haenszel. Se calculó el índice de abundancia de Simpson (λ), para estimar las diferencias entre la composición de las comunidades de parásitos intestinales de las cucarachas en los tres ambientes estudiados (Dash & Dash, 2009). La posible asociación entre la distribución de las taxa parasitarias y los diferentes ambientes muestreados se hizo mediante un Análisis de Correspondencia (Salvador, 2003). Los datos se analizaron mediante paquete estadístico PAST (Versión 3.06) (Hammer *et al.*, 2001), y página Web para cálculos estadísticos StatPages.net (members.aol.com/Johnp71/javastat.html).

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 149 ejemplares de cucarachas (102 imagos y 47 ninfas), correspondiendo 32 (11 imagos y 21 ninfas) al mercado municipal, 62 (46 imagos y 16 ninfas) al recinto universitario, y 55 (45 imagos y 10 ninfas) al HUAV; de acuerdo al estudio morfo-taxonómico comparativo detallado (Ramírez Pérez, 1988; Beccaloni, 2007), los mismos correspondieron a la especie *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) (Fig. 1). De las 149 cucarachas examinadas, el 97,99% (146/149) albergaba una o hasta seis taxa parasitarias; de los tres (2,0%) ejemplares que resultaron negativos, uno era adulto y dos ninfas, que se capturaron en el mercado municipal; no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la presencia parasitaria y el estadio de desarrollo de los insectos ($\chi^2=4,01$; $P=0,12$), ni con respecto al sitio de su captura ($\chi^2=0,00$; $P=1$). El análisis parasitológico de las cucarachas reveló la presencia de 13 taxa entero-parasitarias (Tabla I; Fig.2), de las cuales siete son consideradas de interés médico, incluyendo el cromista *Blastocystis* spp., los protozoarios *Leptomonas* spp., *Cyclospora* spp., *Cystoisospora* spp., *Lophomonas blattarum*, y los helmintos *Ascaris* spp. y *Enterobius vermicularis* (Tabla I). Las taxa más prevalentes fueron *Blastocystis* spp. (82,6%: 123/149) y *Leptomonas* spp. (70,5%: 105/149) (Tabla I). El índice de abundancia (λ) de la fauna parasitaria, incluido su intervalo de confianza

Fig. 2. Taxones parasitarios aislados en la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) en Coro, estado Falcón, Venezuela (2014). A). Promastigotes de *Leptomonas* spp.; B). Trofozoito de *Lophomonas blattarum*; C) Trofozoito de *Lophomonas striata*; D) Trofozoito de *Entamoeba blattae*; E) Trofozoito de *Nyctotherus ovalis*; F) Ooquiste de *Cystoisospora* spp.; G) Huevo de *Enterobius vermicularis*; H) Ooquiste de *Cyclospora* spp. I) y J) Larva y huevo de *Thelastoma* spp.; K) y L) Huevos y macho de *Hammerschmidtella* spp. (10X); M) Forma quística de *Blastocystis* spp. Tinción lugol, 40X.



(95%), para los tres sitios de captura (Mercado municipal, UNEFM y HUAV, respectivamente) fue: 0,71 (0,62-0,76); 0,7895 (0,76-0,81); 0,74 (0,71-0,77). Con la aplicación del Análisis de Correspondencia solo se evidenció una acentuada asociación entre *E. vermicularis* y el recinto hospitalario, y entre *E. coli-Ascaris* spp. con el de tipo educativo (Fig.3).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se demostró la presencia de parásitos entéricos de interés médico-zoonótico en un elevado porcentaje (>97%) de ejemplares de la cucaracha sinantrópica *P. americana*

Tabla I. Enteroparásitos aislados en adultos y ninfas de *Periplaneta americana*, según sitio de recolección.

Enteroparásito identificado	N= 32 Mercado municipal (%)	N= 62 UNEFM** (%)	N= 55 HUAV* (%)	N= 149 Total (%)
Cromistas				
<i>Blastocystis</i> spp.	18 (56,3)	50 (80,7)	55 (100)	123 (82,6)
Protozoarios				
<i>Entamoeba blattae</i>	9 (28,1)	48 (77,4)	42 (76,4)	99 (66,4)
<i>Nyctotherus ovalis</i>	0 (0,0)	5 (8,1)	2 (3,6)	7 (4,7)
<i>Leptomonas</i> spp.	14 (43,8)	43 (69,4)	48 (87,3)	105 (70,5)
<i>Cyclospora</i> spp.	0 (0,0)	16 (25,8)	8 (14,5)	24 (16,1)
<i>E. coli</i>	0 (0,0)	3 (4,9)	0 (0,0)	3 (2,0)
<i>Cystoisospora</i> spp.	0 (0,0)	1 (1,6)	1 (1,8)	2 (1,3)
<i>Lophomonas blattarum</i>	1 (3,1)	3(4,8)	2 (3,6)	6 (4,0)
<i>Lophomonas striata</i>	2 (3,6)	3 (4,8)	3 (4,8)	8 (5,4)
Helmintos				
<i>Ascaris</i> spp.	0(0,0)	1(1,6)	0 (0,0)	1 (0,7)
<i>Enterobius vermicularis</i>	0(0,0)	0(0,0)	3 (5,5)	3 (2,0)
<i>Thelastoma</i> spp.	1(3,1)	9 (14,5)	4 (7,3)	14 (9,4)
<i>Hammerschmidtella</i> spp.	3(9,4)	4 (6,45)	1 (1,8)	8 (5,4)

*Hospital Universitario "Alfredo Van Grieken"; **recinto universitario. N= número de cucarachas analizadas; n= número de insectos positivos.

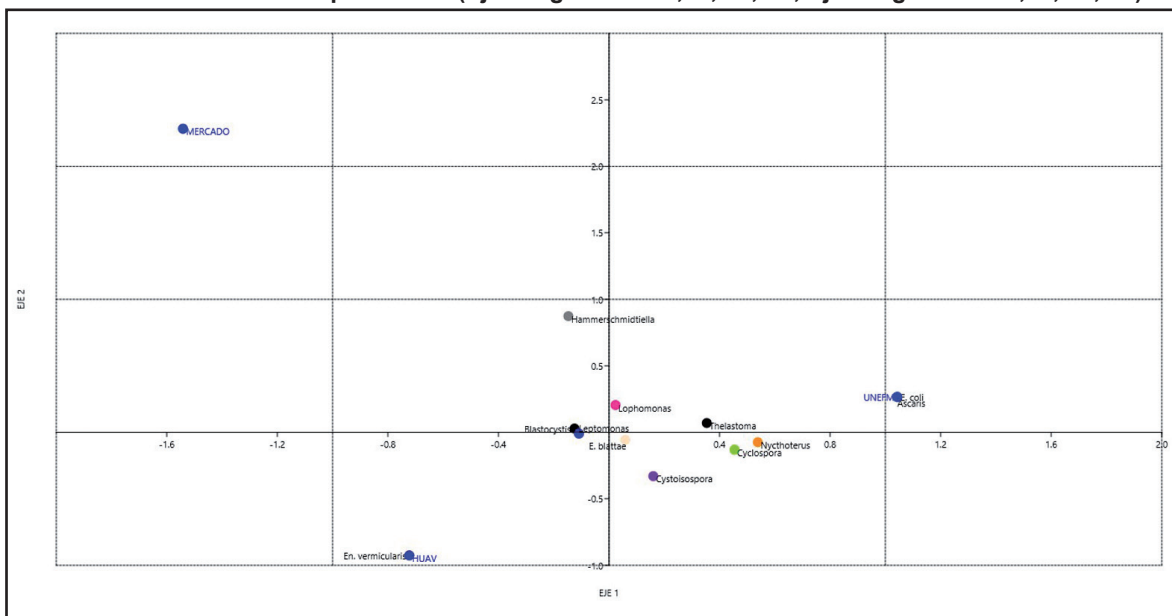
capturados en diversas áreas comunitarias, educativas y hospitalarias; por ello, estos resultados permiten sugerir que estos insectos representan un peligro potencial para la adquisición de enfermedades de origen parasitario, especialmente a nivel nosocomial, en los habitantes de la ciudad de Coro, estado Falcón, Venezuela. Sin embargo, es necesario señalar que la ocurrencia o aislamiento de un parásito intestinal o de cualquier otro microorganismo, en un insecto u otra clase de artrópodo solo es un indicativo de su presencia, y se debe demostrar que el mismo es capaz de transmitirlo (Bejar *et al.*, 2006; Lemos *et al.*, 2006). Por otra parte, el solo hecho de la ocurrencia de cucarachas y de enteroparásitos en su tegumento y tracto gastrointestinal, es un indicador de salubridad deficiente en estos recintos con materia orgánica en descomposición (*e.g.*, heces fecales, alimentos), y que utilizan las ninfas y adultos de las cucarachas para alimentarse, representando de esta manera una fuente potencial de contaminación (Cochran, 1999; Graczyk *et al.*, 2005).

El cromista *Blastocystis* spp., agente causal de diarrea muy importante en el humano (Botero & Restrepo, 2012), resultó ser el taxón de enteroparásito

más frecuentemente detectado en *P. americana*, en más del 80% de los casos; sin embargo, este resultado no debería ser sorprendente, toda vez que por lo general este taxón cromista es el parásito intestinal de mayor prevalencia en humanos en la región falconiana, especialmente en su zona semiárida (Cazorla *et al.*, 2012; 2014). El 82,6% de ocurrencia de *Blastocystis* spp. en *P. americana* de Coro, es mayor que las cifras obtenidas en Perú para esta especie de cucaracha doméstica (49%) (Fernández *et al.*, 2001), Irán (32,3%) (Doroodgar *et al.*, 2006) y Tailandia (1,2%) (Chamavit *et al.*, 2011); llama la atención que las formas quísticas de *Blastocystis* spp. no se han aislado en estudios parasitológicos hechos en cucarachas sinantrópicas en otras regiones del mundo (Etiopía: Kinfu *et al.*, 2008; Hamu *et al.*, 2014; Ghana: Tetteh-Quarcoo *et al.*, 2014; India: Fotedaret *et al.*, 1991; Nigeria: Tattfeng *et al.*, 2005; Adeleke *et al.*, 2012; Egipto: El-Sherbini & El-Sherbini, 2011; El-Sherbini & Gneidy, 2012; Filipinas: Toralbaa *et al.*, 2011).

Los flagelados del género *Leptomonas* spp. (Euglenozoa: Kinetoplastea, Trypanosomatida) fueron los protozoarios aislados con mayor frecuencia,

Fig. 3. Asociación de las taxa parasitarias aisladas de cucarachas y los ambientes muestreados mediante Análisis de Correspondencia (Eje1: eigenvalor=0,05; 63,9%; Eje2: eigenvalor=0,03; 36,0%).



en el 70,5% de los ejemplares de *P. americana* en todos los ambientes muestreados; este porcentaje es mayor al obtenido en Perú de 1,1% también para esta especie de cucaracha (Fernández *et al.*, 2001). Los reportes de este flagelado se hicieron para el país entre 1919 y 1930, incluyendo *L. blaberae* en *Blabera* spp. (Blattodea: Blaberidae), *L. foveati* en *Notocyrtus foveatus* (Hemiptera: Reduviidae), y *L. periplanetae* en *P. australiasiae* (Blattodea: Blattidae) (Díaz Ungría, 1981). *Leptomonas* spp. es un taxón de trypanosomátido monoxénico propio del tubo digestivo insectos, que ocasionalmente puede infectar a humanos, especialmente a individuos inmunocomprometidos, ocasionando patologías a nivel cutáneo o visceral (Srivastava *et al.*, 2010; Sing *et al.*, 2013). Por lo tanto, se hace necesario cultivar y tipificar molecularmente estos aislamientos.

Los entero protozoarios apicomplejos de la clase de los coccidios se encuentran entre los más importantes agentes causantes de diarrea, especialmente en pacientes inmuno comprometidos (Botero & Restrepo, 2012), siendo muy prevalentes en las comunidades del semiárido falconiano (Cazorla *et al.*, 2012; 2014); en las cucarachas capturadas en Coro se logró identificar los ooquistes de los géneros *Cyclospora* spp. y *Cystoisospora* spp., tal como también se ha documentado en Blattidae de Tailandia

(Chamavit *et al.*, 2011), Egipto (El-Sherbini & El-Sherbini, 2011) y Nigeria (Tatfeng *et al.*, 2005).

Se debe resaltar el hallazgo de trofozoitos y quistes del protozooario multiflagelado *Lophomonas blattarum* (Parabasalia: Hypermastigia, Cristomonadida: Lophomonadidae) en 6 (4%) de los ejemplares de *P. americana*; esta cifra de prevalencia en esta especie de cucaracha sinantrópica es mayor a la obtenida en Perú (2,8%) (Fernández *et al.*, 2001), pero menor a la de China (40%) (Yang *et al.*, 2014) y Brasil (12-17%) (Lemos, 1992). A este protozooario se le señala comúnmente como un endocomensal en el tracto intestinal de artrópodos, tales como cucarachas y termitas, y de no ser patógeno para el humano (Zerpa *et al.*, 2010; Martínez-Girón & van Woerden, 2013; 2014). Sin embargo, en la actualidad *L. blattarum* se encuentra entre los protozoarios reconocidos de ocasionar patologías a nivel del tracto respiratorio (lofomoniasis broncopulmonar), especialmente en individuos inmunocomprometidos así como también en asmáticos, tanto adultos como en niños (Zerpa *et al.*, 2010; Martínez-Girón & van Woerden, 2013; 2014). Por lo tanto, existe el riesgo potencial de adquirir, especialmente a nivel nosocomial, lofomoniasis broncopulmonar a través de quistes inhalados o consumidos de materiales contaminados por heces o secreciones de las

cucarachas (e.g., alimentos, polvo, ropas), así como también de termitas (Martínez-Girón & van Woerden, 2013; 2014). La otra especie del género, *L. striata*, también se ha logrado aislar junto con *L. blattarum* (i.e. en condiciones simpátricas), en las cucarachas capturadas en los diversos recintos muestreados; *L. striata* posee cuerpo alargado con estructuras semejantes a agujas colocadas oblicuamente, y se le considera un comensal de las cucarachas sinantrópicas, y a diferencia de su congénere *L. blattarum*, no se le tiene como una especie patógena para el humano (Gile & Slamovits, 2012). *L. striata* y *L. blattarum* fueron señaladas en 1926 y 1959 respectivamente, en *P. americana* en nuestro país (Díaz Ungría, 1981).

Los huevos de los geohelminos del género *Ascaris* spp., agente etiológico de la ascariasis (Botero & Restrepo, 2012), se identificaron solamente en un ejemplar de *P. americana* (0,7 %), cifra muy similar a las detectadas en Tailandia (0,3%) (Chamavit *et al.*, 2011) y Egipto (0,44%) (Amira *et al.*, 2009), pero más bajas que las dadas para Nigeria (17,6-36,6%) (Iboh *et al.*, 2014; Okafor & Elenwo, 2014), e Iraq (3,1- 7,5%) (Hamza & Mahdi, 2010; Al-bayati *et al.*, 2011). La identificación de estos huevos, sugiere que esta cucaracha sinantrópica pudiera estar jugando un papel importante en la epidemiología de los helmintos transmitidos por el suelo, ya que son capaces de recorrer hasta 5 kilómetros en una hora de un sitio a otro (Cochran, 1999; Graczyk *et al.*, 2005).

Los huevos de *Enterobius vermicularis* se identificaron en 3 ejemplares de *P. americana*; sin embargo, es significativo señalar que los oxiuros se encuentra ampliamente prevalente en la región semiárida falconiana tanto del área rural como urbana (Cazorla *et al.*, 2006). Los huevos de este helminto son muy livianos y pueden permanecer viables en el polvo y/o superficies durante 2-3 semanas (Cazorla *et al.*, 2006; Botero & Restrepo, 2012); esto permite que el viento los esparza con suma facilidad por todos los ambientes, y se incrementa el contacto con las cucarachas.

Aunque no poseen relevancia médico-zoonótica, es importante señalar que los nematodos oxiúridos (Thelastomatidae) de los géneros *Hammerschmidtella* spp. y *Thelastoma* spp. detectados en *P. americana* pudieran representar agentes biocontroladores de estos insectos-plaga; de

allí que se hace necesario en ahondar en su estudio biológico y taxonómico (Camino & González, 2012).

Con la aplicación del Análisis de Correspondencia se visualizó que la mayoría de las taxa enteroparasitarias identificadas en *P. americana*, especialmente las de mayor ocurrencia, no mostraron una asociación acentuada con los 3 sitios estudiados de la ciudad de Coro, lo que podría deberse a que esta especie de Blattidae sinantrópica posee una inusitada habilidad para habitar cualquier lugar de los ambientes urbanos. En este sentido, y lo cual pareciera apoyar lo señalado, luce interesante indicar que en poblaciones de *P. americana* de Texas, EEUU, Pechal *et al.* (2008) encontraron que las mismas poseen un flujo genético continuo, sin poder establecerse una relación entre la variación genética y la distribución espacial.

Tal como se demostró en el presente trabajo, *P. americana* posee la potencialidad de transportar agentes parasitarios de interés médico-zoonótico. Por lo tanto, se hace necesario realizar campañas sanitarias con vigilancia epidemiológica, para reducir y controlar las poblaciones de esta especie de cucaracha sinantrópica, con especial énfasis en los ambientes intrahospitalarios, lo que podría disminuir la expansión de estas enfermedades infecciosas de origen parasitario.

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Decanato de Investigación de la UNEFM, Coro-Falcón, Venezuela.

REFERENCIAS

- Adeleke, M., Akatah, H., Hassan, A., Sam-Wobo, S., Famodimu, T., Olatunde, G. *et al.* (2012). Implication of cockroaches as vectors of gastrointestinal parasites in parts of Osogbo, Southwestern Nigeria. *Mun. Ent. Zool.* **7**: 1106-1110.
- Al-bayati N., Al-Ubaidi A. & Al-Ubaidi I. (2011). Risks associated with cockroach *Periplaneta*

- americana* as a transmitter of pathogen agents. *Diyala J. Med.* **1**: 91-97.
- Amira H., Ahmed A., Ahmed G. & Maha S. (2009). Insects as vectors of parasites in Ismalia Governotate. *SCVMJ.* **14**: 213-222.
- Bassirpour G. & Zoratti E. (2014). Cockroach allergy and allergen-specific immunotherapy in asthma: potential and pitfalls. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **14**: 535-541.
- Beccaloni G. (2007). *Blattodea Species File Online*. Version 5.0/5.0. World Wide Web electronic publication. Documento en Línea. Disponible en: <http://Blattodea.SpeciesFile.org> [Consultado: 2014, Mayo, 20].
- Beccaloni G. & Eggleton P. (2011). Order Blattodea Brunner von Wattenwyl, 1882. *Zootaxa.* **3148**: 199-200.
- Bejar V., Chumpitaz J., Pareja E., Valencia E., Huamán A., Sevilla C. et al. (2006). *Musca domestica* como vector mecánico de bacterias enteropatógenas en mercados y basurales de Lima y Callao. *Rev. Perú. Med. Exper. Salud Pú. b.* **23**: 39-43.
- Botero D. & Restrepo M. (2012). *Parasitosis humanas*. 5a edición. Corporación para Investigaciones Biológicas: Medellín, Colombia.
- Camino N. & González S. (2012). Four sympatric species of Thelastomatidae (Nematoda) parasites of American cockroach *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattidae) in La Plata, Argentina. *Neotrop. Helminthol.* **6**: 239-246.
- Cazorla D., Acosta M., Zárraga A. & Morales P. (2006). Estudio clínico-epidemiológico de enterobiasis en preescolares y escolares de Taratara, Estado Falcón, Venezuela. *Parasitol. Latinoam.* **61**: 43-53.
- Cazorla D., Morales P., Chirinos M. & Acosta M. (2009). Evaluación parasitológica de hortalizas comercializadas en Coro, estado Falcón, Venezuela. *Bol. Malariol. Salud Amb.* **49**: 117-125.
- Cazorla D., Acosta M., Acosta M. & Morales P. (2012). Estudio clínico-epidemiológico de coccidiosis intestinales en una población rural de región semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Invest. Clín.* **53**: 173-181.
- Cazorla D., Acosta M., Tortolero J. & Morales P. (2013a). Prevalencia de enteroparásitos porcinos en una comunidad rural de la península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* **23**: 19-25.
- Cazorla D., Morales P. & Chirinos P. (2013b). Evaluación parasitológica de cuatro especies de vegetales utilizados en establecimientos de "comida rápida" en Coro, Falcón, Venezuela. *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.* **4**: 032-046.
- Cazorla D., Leal G., Escalona A., Hernández J., Acosta M. & Morales P. (2014). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **54**: 159-173.
- Chamavit P., Panupong Sahaisook P. & Niamnuy N. (2011). The majority of cockroaches from the Samutprakarn province of Thailand are carriers of parasitic organisms. *EXCLI J.* **10**: 218-222.
- Cochran D. (1999). *Cockroaches: their biology, distribution and control*. World Health Organization. WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.3.: Ginebra, Suiza. World Health Organization, Switzerland. WHO/ CDS/CPS/WHOPES/ 99.3. pp.83.
- Dash M. & Dash S. (2009). *Fundamentals of Ecology*. Third edition. Tata McGraw-Hill Education Pvt. Ltd: Nueva Delhi, India.
- Díaz Ungría C. (1981). Protozoos de Venezuela. *Kasmera.* **9**: 148-215.
- Doroodgar A., Arbabi M. & Asadi M. (2006). Survey on parasitic and fungal agents of Hospital cockroaches in Kashan-2002. *KAUMS J.* **10**: 1-6.
- El-Sherbini G. & El-Sherbini E. (2011). The role of cockroaches and flies in mechanical transmission of medical important parasites. *J. Entomol. Nematol.* **3**: 98-104.

- El-Sherbini G. & Gneidy M. (2012). Cockroaches and flies in mechanical transmission of medical important parasites in Khaldyia Village, El-Fayoum, Governatore, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **42**: 165-174.
- Ewel J., Madriz A. & Tosi Jr. J. (1976). *Zonas de Vida de Venezuela*. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. 2a edición. Editorial Sucre: Caracas, Venezuela.
- Fernández M., Martínez D., Tantaleán M. & Martínez R. (2001). Parásitos presentes en *Periplaneta americana* Linnaeus "cucaracha doméstica" de la ciudad de Ica. *Rev. Per. Biol.* **8**: 105-113.
- Fotedar R., Banerjee U. & Verma A. (1991). Cockroaches (*Blattella germanica*) as carriers of microorganisms of medical importance in hospitals. *Epidemiol. Infect.* **107**: 181-187.
- Gile G. & Slamovits C. (2012). Phylogenetic position of *Lophomonas striata* Bütschli (Parabasalia) from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *Protist.* **163**: 274-283.
- Graczyk T., Knight R. & Tamang L. (2005). Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 128-132.
- Hammer Ø., Harper D. & Ryan P. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **4**: 9.
- Hamu H., Debalke S., Zemene E., Birlie B., Mekonnen Z. & Yewhalaw D. (2014). Isolation of intestinal parasites of public health importance from cockroaches (*Blattella germanica*) in Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *J. Parasitol. Res.* **2014**: 1-5.
- Hamza H. & Mahdi M. (2010). Parasites of cockroach *Periplaneta americana* (L.) in Al-Diwaniya province, Iraq. *J.Thi-Qar Sci.* **2**: 1-12.
- Iboh C., Etim L., Abraham J. & Ajang R. (2014). Bacteria and parasites infestation of cockroaches in a developing community, South Eastern, Nigeria. *Int. J. Bacteriol. Res.* **2**: 45-48.
- Inward D., Beccaloni G. & Eggleton P. (2007). Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biol. Letters.* **3**: 331-335.
- Jeong K., Son M., Lee J., Hong C. & Park J. (2015). Allergenic characterization of a novel allergen, homologous to chymotrypsin, from german cockroach. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **7**: 283-289.
- Kinfu A. & Erko B. (2008). Cockroaches as carriers of human intestinal parasites in two localities in Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**: 1143-1147.
- Kudo R. (1980). *Protozoología*. 6ª impresión. Editorial Continental. S. A. D.F., México.
- Lee, C. (1997). Medical importance of domiciliary cockroaches. *Singapore Microbiol.* **11**: 14 -17.
- Lemos B. (1992). *Parasitismo por enterozoarios en baratas capturadas en Itaguaí e Paracambi, e criadas em Engenheiro Paulo de Frontin: Periplaneta americana e Leucophaea maderae*. Tesis de Maestría, Parasitología Veterinaria, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil.
- Lemos A., Lemos J., Prado M., Pimenta F., Gir E., Silva H., et al. (2006). Cockroaches as carriers of fungi of medical importance. *Mycoses.* **49**: 23-25.
- Martínez-Girón, R. & van Woerden H. (2013). *Lophomonas blattarum* and bronchopulmonary disease. *J. Med. Microbiol.* **62**: 1641-1648.
- Martínez-Girón R. & van Woerden H. (2014). Bronchopulmonary lophomoniasis: emerging disease or unsubstantiated legend?. *Parasit. Vectors.* **7**: 284.
- Okafor-Elenwo E. & Elenwo A. (2014). Human infecting parasitic worms, in cockroaches from Odau in the Niger delta region of Nigeria. *Int. J. Nat. Sci. Res.* **2**: 176-184.
- Pechal J., Austin J., Szalanski A., Gold R. & Tomberlin J. (2009). Genetic analysis of *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) in Central Texas

- using the ITS1 region. *J. Agric. Urban Entomol.* **25**: 179-191.
- Poinar G. (1977). CIH Key to the groups and genera of nematode parasites of invertebrates. Commonwealth Agricultural Bureaux (CAB): Buckinghamshire, Reino Unido.
- Poinar G. & Thomas G. (1978). *Diagnostic manual for the identification of insect pathogens*. Plenum Publishing Corporation: New York, EUA.
- Ramírez Pérez J. (1988). Revisión taxonómica de las cucarachas (Blattaria, Dictyoptera) de Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **28**: 128-150.
- Rust M., Reiersen D. & Hansgen K. (1991). Control of American cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) in sewers. *J. Med. Entomol.* **28**: 210-213.
- Salvador M. (2003). *Análisis de Correspondencias*. Documento en Línea. Disponible en: <http://www.5campus.com/lección/correspondencias>. [Consultado: 2015, Abril, 20].
- Sarpong S., Hamilton R., Eggleston P. & Adkinson Jr. N. (1996). Socioeconomic status and race as risk factors for cockroach allergen exposure and sensitization in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**: 1393-1401.
- Srivastava P., Prajapati V., Vanaerschot M., Van der Auwera G., Dujardin & Sundar, S. (2010). Detection of *Leptomonas* sp. parasites in clinical isolates of Kala-azar patients from India. *Infect. Genet. Evol.* **10**: 1145-1150.
- Singh, N., Chikara, S. & Sundar, S. (2013). SOLiD™ sequencing of genomes of clinical isolates of *Leishmania donovani* from India confirm *Leptomonas* co-infection and raise some key questions. *PLoS One.* **8**: e55738.
- Tatfeng Y., Usuanlele M., Orukpe A., Digbana A., Okodua M., Oviasogie F., et al. (2005). Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches. *J. Vect. Borne Dis.* **42**: 129-134.
- Tetteh-Quarcoo P., Donkor E., Attah S., Duedu K., Afutu E., Boamah I., et al. (2013). Microbial Carriage of Cockroaches at a Tertiary Care Hospital in Ghana. *Environ. Health Insights.* **7**: 59-66.
- Toralba A., Ibarra M., Dy Jacob J., Canlas B., Gironella R. & Ferrer A. (2011). Human parasites recovered from cockroaches *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* at Irisan dumpsite. *SLU Res. J.* **42**: 39-48.
- Tortolero J., Cazorla D., Morales P. & Acosta M. (2008). Prevalencia de enteroparásitos en perros domiciliarios de la ciudad de La Vela, estado Falcón, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* **18**: 312-319.
- Yang, J., Tang, Y., Fang, Z., Tong, Z., Li, Y. & Wang, T. (2014). Investigation on *Lophomonas blattarum* infection in *Periplaneta americana* in Wuhan City. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* **32**: 161-162.
- Zerpa R., Ore E., Patiño L. & Espinoza Y. (2010). Hallazgo de *Lophomonas* sp. en secreciones del tracto respiratorio de niños hospitalizados con enfermedad pulmonar grave. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* **27**: 575-577.

Recibido el 16/06/2015
Aceptado el 28/12/2015

Notas Científicas

Inventario preliminar de anofelinos (Diptera: Culicidae) en áreas endémicas de malaria, municipios Atures y Autana, estado Amazonas, Venezuela

Preliminary survey of anophelines (Diptera: Culicidae) in an endemic area of malaria (Atures and Autana municipalities), Amazonas State, Venezuela

Edith Navarro¹, María Eugenia Grillet², Cristóbal Menare³, Julio Gonzalez⁴ & Hortencia Frontado⁴

RESUMEN

Este trabajo reporta la riqueza de especies de anofelinos (Diptera: Culicidae) encontrada en los principales hábitats acuáticos (lóticos y lénticos) del noroeste del estado Amazonas, una de las principales áreas endémicas de malaria actualmente en Venezuela. Un total de 10 especies del género *Anopheles* Meigen fueron registradas. El subgénero *Nyssorhynchus* Blanchard dominó la fauna de anofelinos con seis especies, seguido por los subgéneros *Anopheles* Meigen y *Stethomyia* Theobald, con dos especies cada uno. Entre las especies encontradas destacan *An. (Nyssorhynchus) darlingi* Root vector principal de la malaria en la región y *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch Arribalzaga *sensu lato*, complejo de especies dentro del cual se encuentra *An. marajoara* (Galvão & Damasceno), especie incriminada como vector de malaria en el estado Bolívar. Este estudio contribuye con la actualización del inventario de especies de la fauna de mosquitos en la región del Escudo Guayanés venezolano.

Palabras clave: *Anopheles*, *Nyssorhynchus*, *Stethomyia*, hábitat acuático, malaria, vectores, Venezuela

En el presente trabajo se muestra un inventario preliminar sobre la diversidad de especies de anofelinos (Diptera: Culicidae) de los principales hábitats acuáticos, tanto lóticos (río, caño, arroyo) como lénticos (laguna, charca, pantano), encontradas en el sector norte, centro y sur del municipio Atures

SUMMARY

We report the species richness of anophelines (Diptera: Culicidae) occurring in the main aquatic habitats (lotic and lentic) of northwestern Amazonas, currently, one of the main endemic areas for malaria in Venezuela. Overall, 10 species of the genus *Anopheles* Meigen were identified. The dominant subgenus *Nyssorhynchus* Blanchard was represented by six species, followed by *Anopheles* Meigen and *Stethomyia* Theobald, both having two species. Among the species collected, we highlight *An. (Nyssorhynchus) darlingi* Root and *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch Arribalzaga *sensu lato*. The former is the main vector of Plasmodium in the region and the second one has been incriminated as a malaria vector in Bolívar State. This study extends the current list of anopheline species of the Atures municipality and provides a more complete picture of the distribution of the mosquitoes of the Venezuelan Guiana Shield region.

Key words: *Anopheles*, *Nyssorhynchus*, *Stethomyia*, hábitat acuático, malaria, vectores, Venezuela

y la comunidad de Campo Florido, municipio Autana, estado Amazonas (Fig. 1), áreas endémicas de malaria en el sur de Venezuela (Metzger *et al.*, 2009. *Malar J.* **8**: 291). Específicamente, se estudiaron los diversos cuerpos acuáticos (sitios potenciales de colonización de anofelinos) accesibles y presentes a lo largo del eje

¹ Dirección de Control de Vectores, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Maracay, Venezuela

² Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³ Dirección Regional de Salud Ambiental (MPPS). Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela.

⁴ Museo Entomológico "Dr. Pablo Cova García", Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" (MPPS). Maracay, Estado Aragua, Venezuela

*Autor de correspondencia: navarrobuono@gmail.com

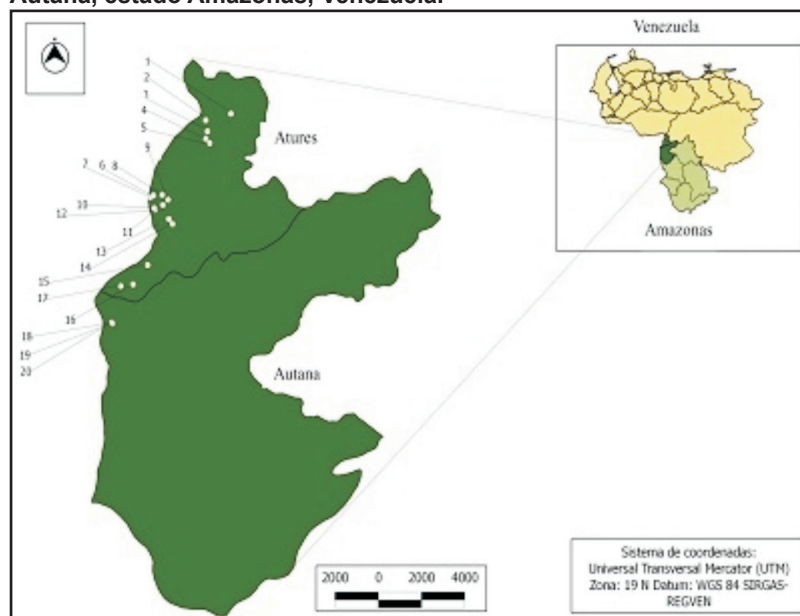
carretero norte (Parroquia Parhueña), sur (Parroquia Platanillal) y la zona central (Parroquias Fernando Girón, Tovar y Luis A. Gómez) del municipio Atures, así como la comunidad de Campo Florido ubicada en la Parroquia Samariapo, municipio Autana (Fig. 1). Un total de 20 sitios fueron muestreados en el año 2009, con una frecuencia mensual y por un periodo de once meses consecutivos (Tabla I). En cada sitio, las fases inmaduras (larvas y/o pupas) de *Anopheles* presentes fueron recolectadas a partir de 30 muestras de agua de 230 ml. realizadas con un cucharón de cono truncado. Las muestras fueron separadas por sitio de captura, etiquetadas y colocadas en bolsas plásticas con agua

del hábitat y trasladadas al laboratorio de la Unidad Entomológica de la Dirección General de Salud Ambiental (MPPS), en Puerto Ayacucho, capital del municipio Atures, para su identificación mediante el uso de las claves taxonómicas apropiadas (Cova García & Sutil, 1997. *Claves gráficas para la clasificación de los Anofelinos de Venezuela*. Pub. Div. End. Rurales, Dir. Malariol. San. Amb. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Maracay, Venezuela. 92 pp; Faran & Linthicum, 1981. *Mosq. Syst.* **13**: 1-81; Navarro, 1996. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **36**: 25-43). Siempre que fue posible, se procedió a desarrollar los inmaduros hasta adultos efectuando crías asociadas (Belkin *et*

Tabla I. Localidad y especies recolectadas en los municipios Atures y Autana, estado Amazonas, Venezuela. 2009.

Localidad	Coordenadas	Especie
1 Sarón	05°59'22,72" N; 67°17'41,65"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. triannulatus s.l.</i>
2 Bambú Lucera	05°57'55,91"N; 67°23'59,73"O	<i>An. braziliensis</i> , <i>An. mediopunctatus s.l.</i>
3 Monte Blanco	05°55'28,67"N; 67°23'32,66"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. argyritarsis</i>
4 Puente Parhueña	05°53'47,29"N; 67°23'59,49"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. oswaldoi s.l.</i> , <i>An. argyritarsis</i> , <i>An. punctimacula s.l.</i>
5 Limon Parhueña	05°52'41,37"N; 67°23'01,86"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. punctimacula s.l.</i>
6 Bolsillo Malave	05°41'17,06"N; 67°37'15,16"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. argyritarsis</i> .
7 Loma Guacharacaz	05°40'35,08"N; 67°37'52,36"O	<i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. triannulatus s.l.</i> , <i>An. kompi</i> .
8 Sector 57	05°40'46,39"N; 67°34'53,24"O	<i>An. braziliensis</i>
9 Mangal	05°39'56,37"N; 67°33'30,01"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. argyritarsis</i> , <i>An. kompi</i> .
10 San Enrique Paila	05°38'02,55"N; 67°36'57,26"O	<i>An. darlingi</i>
11 Teri	05°38'47,57"N; 67°34'48,13"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. argyritarsis</i> .
12 San Enrique Bajo	05°37'44,77"N; 67°36'45,47"O	<i>An. darlingi</i>
13 Reforma	05°35'37,86"N; 67°33'18,35"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. mediopunctatus s.l.</i>
14 Danta	05°34'30,81"N; 67°32'24,49"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. oswaldoi s.l.</i>
15 Platanillal	05°25'14,29"N; 67°38'37,84"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. mediopunctatus s.l.</i>
16 Guayabal	05°20'52,89"N; 67°42'17,42"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. mediopunctatus s.l.</i> , <i>An. argyritarsis</i>
17 Porvenir	05°20'30,53"N; 67°45'20,91"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. oswaldoi s.l.</i>
18 Campo Florido II	05°12'03,83"N; 67°47'06,98"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. argyritarsis</i> , <i>An. nimbus</i>
19 Campo Florido I	05°12'02,54"N; 67°47'27,47"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i> , <i>An. oswaldoi s.l.</i>
20 Campo Florido III	05°12'17,70"N; 67°47'38,99"O	<i>An. darlingi</i> , <i>An. braziliensis</i>

Fig. 1. Ubicación geográfica del área de estudio, municipios Atures y Autana, estado Amazonas, Venezuela.



Área de estudio: **Parroquia Parhueña** 1= Sarón; 2= Bambú Lucera; 3= Monte Blanco; 4= Puente Parhueña; 5= Limón de Parhueña; **Parroquia Fernando Girón T.** 6= Bolsillo Malavé; 7= Lomas Guacharaca; **Parroquia Luis A. Gómez** 8= Sector 57; 9= Mangal; 10= San Enrique (Paila); 11= Teri; 12= San Enrique (Bajo); **Parroquia Platanillal** 13= Reforma; 14= Danta; 15= Platanillal; 16= Guayabal; 17= Porvenir; 18= Campo Florido II; 19= Campo Florido I; 20= Campo Florido III.

al., 1965. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) II. Method for the collection, rearing and preservation of mosquitoes. *Contrib. Am. Ent. Inst.* **1**: 19-78).

Se identificaron un total de diez especies pertenecientes al género *Anopheles* (Tablas I y II). La mayoría de las especies, un total de seis, pertenecían al subgénero *Nyssorhynchus* Blanchard: *Anopheles darlingi*, *An. albitarsis s.l.*, *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy, *An. oswaldoi (Peryassú) s.l.*, *An. triannulatus (Neiva & Pinto) s.l.* y *An. braziliensis* (Chagas). El siguiente subgénero representado fue *Anopheles* Meigen, con dos especies, *An. punctimacula* Dyer & Knab s.l. y *An. mediopunctatus (Lutz) s.l.*, seguido por el subgénero *Stethomyia* Theobald, también con dos especies: *An. kompi* Edwards y *An. nimbus* (Theobald).

El reporte de algunas de las especies en este estudio coincide con el previamente realizado por Rubio-Palis *et al.* (2005, *Entomotropica*. **20**: 29-38) para el estado Amazonas, en el área de Ocamo, municipio Alto Orinoco, donde se observaron cuatro especies: *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. triannulatus s.l.* y *An. braziliensis*, pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus*. Igualmente, concuerda con la distribución fisiográfica de los vectores de malaria

en Venezuela (Osborn *et al.*, 2004. *Bol. Mal. Salud Amb.* **44**: 77-92). Según la última revisión del género *Anopheles* realizada por Rubio-Palis (2005, *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 1-10) para Venezuela, existen 41 especies válidas, incluyendo las especies de la serie *Arribalzagia*, *An. (Ano.) forattinii* Wilkerson & Sallum y *An. costai* (Fonseca & Ramos). *Anopheles forattinii* ha sido reportada en el municipio Alto Orinoco del estado Amazonas (Rubio-Palis *et al.*, 2005. *op. cit.*) y *An. costai* en el municipio Sifontes del estado Bolívar (Moreno & Rubio-Palis, 2003. *Entomotropica*. **18**: 211-213). Ahora bien, teniendo en cuenta que los adultos de estas tres especies, *An. mediopunctatus*, *An. costai* y *An. forattinii*, son prácticamente indistinguibles (Wilkerson & Sallum, 1999. *J. Med. Entomol.* **36**: 345-354; Rubio-Palis, 2005. *op. cit.*), se plantea la necesidad de realizar estudios futuros taxonómicos que incluyan crías asociadas en el área de estudio a fin de confirmar la presencia e identidad de *An. mediopunctatus s.l.* acá reportado, así como corroborar o descartar la coocurrencia o no de las otras dos especies de la serie *Arribalzagia*. Similarmente, se recomienda realizar una revisión cuidadosa del material existente en diversas colecciones del país, donde se ha reportado e identificado a *An. mediopunctatus* a fin de corroborar la presencia en Venezuela de *An. mediopunctatus* *sensu*

Tabla II. Especies de Anopheles identificadas en los municipios Atures y Autana, estado Amazonas (2009).

Especies de Anofelinos	N° de Ejemplares
<i>An. (Nyssorhynchus) darlingi</i> Root	91
<i>An. (Nyssorhynchus) braziliensis</i> (Chagas)	40
<i>An. (Nyssorhynchus) albitarsis</i> Lynch Arribalzga <i>sensu lato</i>	38
<i>An. (Nyssorhynchus) triannulatus</i> (Neiva & Pinto) s.l.	18
<i>An. (Nyssorhynchus) oswaldoi</i> (Peryassú) s.l.	15
<i>An. (Anopheles) mediopunctatus</i> (Lutz) s.l.	9
<i>An. (Stethomyia) kompi</i> Edwards	2
<i>An. (Nyssorhynchus) argyritarsis</i> Robineau-Desvoidy	24
<i>An. (Anopheles) punctimacula</i> Dyer & Knab s.l.	3
<i>An. (Stethomyia) nimbus</i> (Theobald)	4

stricto. Wilkerson & Sallum (1999. *op. cit.*), verificaron por primera vez la existencia de este complejo en Sur América, Brasil, específicamente en la región costera del estado de São Paulo, en Río de Janeiro y Paraná.

En cuanto al complejo *albitarsis*, actualmente existen ocho especies reconocidas dentro de este complejo (*An. albitarsis* s.s., *An. albitarsis* F, *An. albitarsis* G, *An. albitarsis* I, *An. deaneorum*, *An. janconnae*, *An. marajoara* y *An. oryzalimnetes*), adicionalmente a la existencia de un linaje, *An. albitarsis* H (Ruiz-Lopez *et al.*, 2012. *Parasite Vectors*. 5:44). La distribución geográfica de los miembros de este complejo es amplia y abarca a Centro y Sur América (Sinka *et al.*, 2010. *Parasite Vectors*. 3: 72). En Venezuela, trabajos previos al año 2003 referían la ocurrencia de la especie *An. albitarsis* s.l. (Rubio-Palis, 2000. *Anopheles (Nyssorhynchus) de Venezuela: Taxonomía, Bionomía, Ecología e Importancia Médica*. Publicaciones del *Bol. Malariol. San. Amb. Maracay*. 124p). Posteriormente, con base en estudios morfológicos y moleculares, se reporta para Venezuela a *An. marajoara* (Rubio-Palis *et al.*, 2003. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* 19: 107-114). Recientemente, se ha registrado la presencia de *An. albitarsis* F en los municipios Sucre y Cedeño del estado Bolívar (Rubio-Palis *et al.*, 2013. *Bol. Mal. Salud Amb.* 53: 68-72), por lo que es fundamental confirmar con técnicas moleculares la(s) especie(s) de *An. albitarsis* s.l. presentes en los municipios Atures y Autana.

Entre las especies encontradas en este estudio destaca *Anopheles darlingi*, especie con una amplia distribución geográfica, encontrándose en Centro y

Suramérica desde el Sur de México hasta el Norte de Argentina, así como del este de la cordillera andina hasta las costas del Atlántico (Forattini, 1987. *Rev. Saude Publica.* 21: 291-304; Deane *et al.*, 1948. *Rev. Serv. Espec. Saude Publ.* 1: 827-965; Rachou, 1958. *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop.* 10: 145-181; Komp, 1941. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 659-670). *Anopheles darlingi* es considerado el principal vector de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* en la cuenca amazónica (Zimmerman, 1992. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87: 371-383; Lounibos & Conn, 2000. *Am. Entomologist.* 46: 237-248). En Venezuela, es el vector principal de malaria en el foco sur, el cual abarca los estados Bolívar, Delta Amacuro y Amazonas región que produce cerca del 84% de esta enfermedad en el país (Aché, 1998. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* 38: 68-72; Moreno *et al.*, 2009. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 764-768; Magris *et al.*, 2007. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102: 303-311; Osborn *et al.*, 2004. *op. cit.*; Rubio Palis & Zimmerman, 1997. *J. Med. Entomol.* 34: 499-51). Igualmente, es vector de malaria en los bosques interiores de tierras bajas y sabanas (ecotonos), principalmente ubicadas al sur del Río Orinoco (Escudo Guayanés venezolano), donde *An. marajoara* y *An. braziliensis* son considerados vectores secundarios (Rubio-Palis *et al.*, 2005. *op. cit.*).

Finalmente, otra de las especies encontradas en este estudio merece un particular comentario, *An. nimbus*. Esta especie fue registrada previamente en Amazonas (Cova García, 1951. *Publicac. Div. Malariol.* 10: 7-226; Sutil, 1980. *Publicac. Div. Endemias Rurales*, 37pp.). Sin embargo, es una

especie poco estudiada en el país, aunque se conoce que su hábitat natural se encuentra dentro del bosque en los márgenes de quebradas, manantiales o ríos muy sombreados y con poca corriente (Cova-García, 1951. *Publicac. Div. Malariol.* **10**: 7-226). Concluyendo, el presente estudio ha actualizado el inventario de especies para los municipios Atures y Autana, constituyendo un nuevo aporte al conocimiento de la distribución geográfica de la fauna de mosquitos en la región del Escudo Guayanés venezolano.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no han habido conflictos de intereses durante el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (Dr. Jesús Berti) por su incentivo y apoyo incondicional para efectuar las salidas al campo; igualmente a la Dirección Regional de Salud Ambiental del estado Amazonas por su apoyo con la logística (Dr. Julio González, Dr. Aníbal Girón, Tec. Juan Rodríguez). Agradecemos especialmente al Dr. Juan Carlos Navarro, quien realizó la confirmación taxonómica de las muestras de anofelinos colectadas. Finalmente, MEG & EN agradecen el financiamiento del Fondo Nacional de Investigaciones Científicas (FONACIT, UC-2008000911-3), el cual hizo posible parte del desempeño de este trabajo.

Recibido el 25/05/2015
Aceptado el 30/12/2015

Mordedura de ciempiés (Chilopoda) en humanos: un registro de cuatro casos en México

Centipede (Chilopoda) bite in humans: a report of four cases in Mexico

Fabio Germán Cupul-Magaña^{1*}, Herminio Terán-Flores², Julián Bueno-Villegas³ & Armando H. Escobedo-Galván¹

RESUMEN

Hasta la fecha no existen registros disponibles sobre casos de mordeduras y envenenamiento de ciempiés (Chilopoda) en México. Sin embargo, algunas de las especies principalmente del Orden Scolopendromorpha suelen encontrarse en zonas urbanas y ser de gran tamaño (longitud total >10 cm), lo cual puede ser de riesgo potencial para la salud de los pobladores. En este trabajo se presentan cuatro casos de mordeduras causadas por escolopendromorfos (Género *Scolopendra*) en diferentes lugares de la República Mexicana. El grado de envenenamiento, dependiendo del caso, provocó desde dolores intensos hasta el presunto fallecimiento de un niño. Por otra parte, se documenta por primera vez el uso de antiveneno para alacrán en el tratamiento de mordedura de ciempiés; resultado que puede estimular el desarrollo de investigaciones sobre toxinas presentes tanto en el veneno de alacrán como de ciempiés, y el uso de tratamientos similares. Aunque las mordeduras y envenenamientos de ciempiés en México son poco frecuentes, es importante establecer un protocolo médico estandarizado en los instituciones de salud pública para que puedan ser atendidos con éxito.

Palabras clave: Myriapoda, envenenamiento, salud pública, Scolopendromorpha.

Los ciempiés (Chilopoda) son artrópodos depredadores terrestres que se caracterizan por presentar el cuerpo deprimido dorsoventralmente y multisegmentado, donde la cabeza se encuentra diferenciada del tronco, así como un par de patas por segmento (Lewis, 1981. *The biology of centipedes*. Cambridge University Press, Cambridge; Edgecombe & Giribet, 2007. *Ann. Rev. Entomol.* **52**: 151-170; Minelli, 2011a. En: *Treatise on Zoology – Anatomy,*

SUMMARY

Currently, there is a notable paucity of information on bites and poisonings by centipede (Chilopoda) in Mexico. Some species of the Order Scolopendromorpha shows large body sizes (total length >10 cm) and commonly occurs in urban areas; which could be a latent risk for the residents. Here, we reported four cases of centipede bite (Scolopendra genus) in different regions of Mexico. The intoxication level varied in each case, from severe pains to presumed death by poisoning in a child. On the other hand, for first time, it is reported the use of scorpion antivenom in treating centipede bite; which could stimulate a new window research in relation to the toxins both scorpions and centipedes, and the application of similar treatments in accident cases. Although centipede bites and poisonings in Mexico are rare, it is important to establish a standardized medical protocol in public health institutions.

Key words: Envenomation, Myriapoda, public health, Scolopendromorpha.

Taxonomy, Biology: *The Myriapoda*, Vol. 1. Ed. Minelli, 21. Brill, Leiden). Poseen un par de colmillos o forcípulas por debajo de la cabeza en cuya base se encuentran glándulas de veneno, las cuales se abren camino al exterior por un conducto que desemboca cerca de la punta de las afiladas forcípulas. Al morder, los ciempiés inyectan sus toxinas para someter a sus presas o para defenderse de un potencial depredador (Lewis, 1981. *Op. cit.*; Eisner *et al.*, 2005. *Secret*

¹ Centro Universitario de la Costa, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 203, Delegación Ixtapa, C.P. 48280. Puerto Vallarta, Jalisco, México.

² Centro Toxicológico del Hospital Ángeles Lomas, Av. Vialidad de la Barranca S/N, Valle de las Palmas, C.P. 52763, Huixquilucan de Degollado, Estado de México, México.

³ Laboratorio de Sistemática Animal, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo km. 4.5 S/N, Colonia Carboneras, C.P. 42184, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

*Autor de correspondencia: fabiocupul@gmail.com

weapons: defenses of insects, spiders, scorpions, and other many-legged creatures. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge; Minelli, 2011a. *Op. cit.*; Rosenberg *et al.*, 2011. En: *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology: The Myriapoda*, Vol. 1. Ed. Minelli, 84-97. Brill, Leiden). Contrario a lo que dicta la creencia popular, los ciempiés no “pican” con sus patas caminadoras ni con sus patas traseras, ya que no tienen aparato inoculador en ellas.

El veneno de los ciempiés es una mezcla de compuestos capaz de afectar el sistema nervioso de insectos, paralizándolos e impidiéndoles moverse, o al sistema nervioso autónomo de vertebrados con impacto negativo en la tasa respiratoria, frecuencia cardíaca y el tono muscular (Eisner *et al.*, 2005. *Op. cit.*). Entre los compuestos tóxicos de su veneno se encuentran péptidos, aminas, proteasas, esterases, hialuronidasas, histamina, serotonina, entre otros (Lewis, 1981. *Op. cit.*; Eisner *et al.*, 2005. *Op. cit.*; Undheim & King, 2011. *Toxicon*. **57**: 512-524; Yang *et al.*, 2013. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**: 17534-17539). Al respecto, Undheim & King (2011, *Op. cit.*) realizaron una revisión completa de las toxinas presentes en el veneno de los ciempiés y su actividad tóxica.

Las 3.118 especies de ciempiés descritas (Zhang, 2013. *Zootaxa*. **3703**: 017-026) están agrupadas en cinco órdenes: Scutigermorpha, Lithobiomorpha, Craterostigmomorpha, Scolopendromorpha y Geophilomorpha (Minelli, 2011b. *Zootaxa*. **3148**: 1-237). Entre ellas, los escolopendromorfos, son los que con mayor frecuencia están involucrados en casos de mordeduras en humanos (Lewis, 1981. *Op. cit.*; Undheim & King, 2011. *Op. cit.*), posiblemente porque alcanzan las tallas más grandes dentro del grupo (10 a 30 cm). Además, por su naturaleza benigna, la mayoría de los casos de mordeduras y envenenamientos nunca son registrados por los hospitales o los médicos (Undheim & King, 2011. *Op. cit.*). A pesar de lo anterior, se han registrado decesos como resultado de infecciones secundarias más que por el propio envenenamiento (Undheim & King, 2011. *Op. cit.*). Sin embargo, algunas muertes por envenenamiento se han documentado en Filipinas, las islas Rodríguez y Tailandia (Undheim & King, 2011. *Op. cit.*), así como Venezuela (De Sousa *et al.*, 2014. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*. **26**: 441-457). Por otra parte, cuando un

ciempiés muerde, la mordedura se describe como la sensación de penetración por una aguja hipodérmica y, en el sitio de la herida, se pueden apreciar dos marcas de punción, con o sin hemorragia (Alexander, 1984. *Arthropods and human skin*. Springer-Verlag, Berlin). Prácticamente, todos los envenenamientos causados por ciempiés se caracterizan por presentar los siguientes síntomas: dolor inmediato, quemante y localizado que varía en intensidad de insoportable a leve y que, en algunas ocasiones, irradia a otras partes del cuerpo; inflamación localizada; eritema; así como complicaciones frecuentes relacionadas con la mordedura como necrosis, parestesia, letargia, sensación quemante alrededor de la mordedura, sudoración en el área afectada, aumento de la frecuencia respiratoria, arritmia, fiebre, ansiedad, condición de estupor, mareo y náusea (Alexander, 1984. *Op. cit.*; Undheim & King, 2011. *Op. cit.*).

En México se conocen 182 especies de ciempiés. Su distribución se observa en casi todo el territorio nacional (Flores-Guerrero *et al.*, 2015. *Dugesiana*. **22**: 69-80) y se han registrado especies de escolopendromorfos con tallas superiores a los 10 cm (Cupul-Magaña, 2009. *Dugesiana*. **16**: 81-85; Cupul-Magaña, 2010. *Brenesia*. **73-74**: 133-134; Cupul-Magaña & Bueno-Villegas, 2015. *Bol. Mus. Entomol. Univ. Valle*. **15**: 7-9). En su veneno se han aislado compuestos potencialmente tóxicos (Muñoz-Andrade *et al.*, 2005. Aislamiento y caracterización del péptido responsable de la actividad hialuronidasa presente en el veneno del ciempiés (*Scolopendra viridis* Say, 1821). XI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., Mérida, México; Muñoz-Andrade, 2006. Purificación y caracterización de la proteína responsable de la actividad hialuronidasa presente en el veneno del ciempiés (*Scolopendra viridis* Say, 1821). Trabajo de grado de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, México; González-Morales *et al.*, 2009. *Toxicon*. **54**: 8-15; González-Morales *et al.*, 2014. *J. Proteomics*. **111**: 224-237) y en la literatura médica o científica no se ha documentado ningún caso de mordedura y envenenamiento. El objetivo de esta nota es documentar, por primera vez para México, cuatro casos de mordedura por ciempiés sobre humanos en distintas localidades del país y así contribuir al conocimiento de la interacción entre las personas y este grupo de artrópodos potencialmente nocivos y de importancia médica en ambientes urbanizados.

La documentación de tres de los cuatro casos se realizó a partir de la extracción de información de los testimonios directos de dos pacientes y el relato de un testigo de hechos. Estos casos sucedieron el 30 de mayo del 2015 en la ciudad de Puerto Vallarta, Jalisco (20°35'48"N y 105°13'52"O), en noviembre del 2008 en un bosque de pino de la localidad de Cruz de Mujer, municipio de Omitlán de Juárez, Hidalgo (20°09'50"N y 98°36'38"O), así como en el año de 1998 en el municipio Izúcar de Matamoros (coordenada media 18°36'01"N y 98°27'56"O). El cuarto caso corresponde al trabajo clínico realizado el 6 de junio de 2015 en las instalaciones del Centro Toxicológico del Hospital Ángeles Lomas en Huixquilucan de Degollado, Estado de México.

Primer caso

Un hombre de complexión atlética, estatura de 1,65 m y edad de 36 años, se encontraba la mañana del 30 de mayo realizando labores de limpieza de escombro y maleza en el patio trasero de su casa. Al levantar del suelo una pieza laminar de metal, observó los rápidos movimientos del ciempiés hasta que éste logró subirse a su mano izquierda y propinarle una mordida en la parte dorsal anterior (sin hemorragia), por debajo de los nudillos de los dedos anular y cordial (no se observó la marca de la mordida; Fig. 1). Inmediatamente experimentó dolor intenso en el área afectada, sensación que se prolongó por 24 horas.

Algunos minutos después, el dolor irradió hasta la muñeca y experimentó parestesia y letargia (estos dos últimos síntomas se prolongaron por 48 horas más). También se presentó inflamación y eritema focalizado, principalmente en el nudillo del dedo cordial. Dentro de los primeros 10 a 15 minutos posteriores a la mordida, la víctima experimentó sensación de cuerpo extraño en la garganta, situación que lo alertó y llevó a solicitar atención de urgencia en el Hospital Regional de Puerto Vallarta, donde fue atendido una hora y media después del evento.

De acuerdo con lo que comenta el paciente, para tratar sus síntomas el médico le administró vía intramuscular una sola dosis de antiveneno antialacrán, ya que el hospital no disponía de camas para ingresarlo y administrárselo vía intravenosa. Tras una mejora significativa por la desaparición de la sensación de cuerpo extraño en la garganta, fue dado de alta con la consigna de regresar si el

síntoma se presentara de nuevo. Se le recomendó aplicarse un leve torniquete a la altura de la muñeca e hidratarse continuamente por vía oral. El afectado refiere que durante las 24 horas posteriores a su alta hospitalaria experimentó fiebre (no recordó el dato de temperatura). Una semana después de la mordedura el paciente se encontraba perfectamente recuperado.

Segundo caso

Un hombre de complexión mediana, estatura de 1,79 m y con 44 años de edad sufrió una mordedura, alrededor de las 9:00 horas (es día exacto de la mordedura se desconoce), cuando intentó capturar un ejemplar de la especie *Scolopendra polymorpha* que se encontraba debajo de la corteza de un tronco de pino en descomposición. La mordedura fue propinada en la parte externa del dedo índice de la mano izquierda. Apenas una gota de sangre se observó en cada perforación producida por la mordida. Inicialmente, el dolor fue intenso y se incrementó durante la siguiente media hora. Se irradió a lo largo del brazo, el hombro y lado izquierdo del cuello. La sensación de dolor se extendió aproximadamente durante nueve horas. No se recurrió a ningún tipo de auxilio o tratamiento médico.

Tercer caso

Un accidente no confirmado con información insuficiente de datos específicos sobre el evento. Tratándose de un niño, entre cuatro y seis años de edad, quien murió como consecuencia del envenenamiento producido por la mordedura

Fig. 1. Detalle de la inflamación y eritema (marcados dentro del círculo negro) en la mano izquierda del paciente de Puerto Vallarta, Jalisco, México.



de un ciempiés de aproximadamente 18 cm de longitud (no se especificó el sitio de la mordida en el cuerpo ni tratamiento que el afectado recibió). Esta información fue proporcionada por un ex-empleado de la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) de la región.

Cuarto caso

Tratamiento a un paciente de 60 años por intoxicación debido a la mordedura de ciempiés; quien no presentó lesiones de importancia, sólo hiperhemia en el dedo de la mano izquierda y discreta hinchazón; sin embargo, experimentó dolor intenso 10/10 que requirió tratamiento con esteroide antihistamínico, analgésico tipo AINE, y por la persistencia, se llegó hasta analgésico opioide. Aproximadamente cinco horas después de haber ingresado, con mejoría en intensidad de dolor 3/10, fue dado de alta con tratamiento antibiótico profiláctico por cinco días.

Sobre el primer caso, aunque la persona sacrificó al ciempiés momentos después de que fue mordido y no lo preservó, mencionó tres características que nos permitieron inferir que se trataba de *Scolopendra polymorpha* Wood, 1861 (Fig. 2): talla aproximada entre 8-10 cm, cabeza roja y una delgada banda transversal oscura en la parte posterior de los terguitos (Baerg, 1924. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **27**: 343-352; Shelley, 2002. *Virginia Museum of Natural History*. **5**: 1-108). Este último rasgo le da su nombre común de ciempiés tigre, el cual se encuentra ampliamente distribuido en México (Cupul-Magaña, 2013. *Dugesiana*. **20**: 17-41).

Fig. 2. Ejemplar adulto de *Scolopendra polymorpha* o ciempiés tigre.



Con relación a los casos tercero y cuarto casos antes referidos, conviene señalar que no se dispone de información precisa sobre la especie de ciempiés involucrada en las mordeduras, debido a que las personas afectadas no capturaron al animal. Sin embargo, los sitios donde ocurrieron los accidentes se incluyen dentro del ámbito de distribución de ciempiés escolopendromorfos de tallas superiores a los 10 cm y con potencial de provocar mordidas de consideración (Cupul-Magaña, 2013. *Op. cit.*; Flores-Guerrero *et al.*, *Op. cit.*).

Las identificaciones taxonómicas incorrectas (o la ausencia de estas) pueden conducir a conclusiones equivocadas (Bortolus, 2008. *Ambio*. **37**: 114-118; Bortolus, 2012. *Trends in Ecology and Evolution*. **27**: 655). La anterior premisa se aplica categóricamente en los casos de salud pública, donde es decisivo identificar correctamente a un vector o animal potencialmente nocivo para definir los protocolos de tratamiento en los pacientes afectados (Cienfuegos *et al.*, 2008. *Revista Biomédica*. **19**: 35-44; Burelo-Ramos *et al.*, 2012. *Kuxulkab'*. **18(35)**: 61-64; Ponce-Saavedra & Francke, 2013. *Biológicas*. **15(1)**: 52-62). Por lo tanto, es sumamente importante que las instituciones de salud sean asesoradas en la determinación taxonómica por instituciones de investigación o de educación superior.

Por otra parte, no existen en la literatura casos de la aplicación de antiveneno antialacrán para el tratamiento de los síntomas de envenenamiento por mordedura de ciempiés documentado en el primer caso. Es posible que el éxito en este paciente lo provocara una reacción cruzada de las toxinas con el antiveneno. Una investigación derivada de este caso sería el análisis del veneno de las especies del género *Scolopendra* de la región de Puerto Vallarta, con la finalidad de establecer si tienen toxinas similares a las de los alacranes y verificar si éstas son reconocidas por el antiveneno antialacrán (Lourival D. Possani, comunicación personal).

En Venezuela, en la localidad de Adícora, el tratamiento terapéutico satisfactorio para este tipo de envenenamientos por mordedura de ciempiés ha consistido en realizar asepsia y antisepsia tópica de las heridas con solución antiséptica yodada (Povidona®); administrar por vía endovenosa hidrocortisona (una ampolla de 500 mg dosis única) + 500 ml de solución Ringer lactato; analgésico antiinflamatorio

no esteroideo (Ketoprofeno®) por vía oral (100 mg/8 horas/3 días) y, en niños, jarabe Diclofenac® 1cc/kg. Además, en un caso que presentó absceso, se administró antibiótico-terapia (Oxacilina®) (1 gr por vía intravenosa/8 horas/3 días) y luego vía oral (a razón de 500 mg/6 horas/5 días). Adicionalmente, se aplicó intramuscularmente toxoide antitetánico (Carzola-Perfetti *et al.*, 2012. *Acta Toxicol. Argent.* **20(1)**: 25-33).

Aunque en México la incidencia de envenenamientos es poco frecuente, es importante el desarrollo de un protocolo médico estandarizado para el tratamiento de mordeduras y envenenamientos por ciempiés, similar al que actualmente se aplica en el país en el caso de envenenamiento por picadura de alacrán, con la finalidad de orientar sobre el manejo, tratamiento y profilaxis a los enfermos (Dirección General de Epidemiología, 2012. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la intoxicación por picadura

de alacrán. Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. México). Así, de manera general, el protocolo a seguir (de ser posible) es identificar al ciempiés agresor, lavar la herida con agua y jabón, aplicar hielo o compresas, administrar analgésicos y anestésicos locales subcutáneos, prescribir tratamiento antibióticos y aplicar vacuna antitetánica (Alexander, 1984. *Op. cit.*).

Conflicto de intereses

No surgieron conflictos de intereses en el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Editor y a los dos revisores anónimos por sus sugerencias que mejoraron sustancialmente el manuscrito.

Recibido el 20/07/2015
Aceptado el 30/12/2015

Revista de revistas



□ KNAPP J., McDONALD M., MALONE D., HAMON N. & RICHARDSON J. H. (2015). **Disruptive technology for vector control: the Innovative Vector Control Consortium and the US Military join forces to explore transformative insecticide application technology for mosquito control programmes** (*Tecnología novedosa para el control de vectores: El Consorcio Innovativo para el Control de Vectores y la Milicia de los EE.UU, unen esfuerzos para explorar tecnologías transformativas de aplicación de insecticidas para programas de control de mosquitos*). *Malar. J.* **14**: 371.

Armed Forces Pest Management Board (AFPMB), 2460 Linden Lane, Silver Spring, MD 20910, USA

La tecnología para el control de la malaria ha permanecido estática en el tiempo, y existe una imperiosa necesidad de innovar herramientas y tecnologías de control para mejorar radicalmente la capacidad y eficiencia de las prácticas actuales en el control de vectores. Este reporte resume un taller, organizado por El Consorcio Innovativo para el Control de Vectores (IVCC) conjuntamente con el Comité para el Manejo de Plagas de las Fuerzas Armadas de los EEUU (AFPMB), enfocados en la tecnología de aplicación de plaguicidas para la salud pública. Se discutieron tres principales tópicos: las limitaciones que se presentan con herramientas y técnicas actuales usadas en el rociamiento residual intradomiciliario (IRS), tecnologías innovativas para mejorar su eficacia y tecnologías de aplicación verdaderamente innovadoras. El equipo identificó varias formas para mejorar las tecnologías de aplicación que incluyen: asegurar que en todos aquellos programas donde se aplique la estrategia de rociamiento residual intradomiciliario (IRS) utilicen válvulas de flujo constante y boquillas resistentes a la erosión; introducir mejoras en la compresión del pulverizador que ayuden a minimizar los residuos de plaguicidas y los errores humanos; y abarcar el potencial para nuevas técnicas de manejo de criaderos larvales y tecnologías de próxima

generación, tales como “*inteligentes*” sistemas de rociado sin operador. El encuentro sirvió para establecer las bases e incentivar la más amplia colaboración entre el Consorcio Innovativo para el Control de Vectores (IVCC) y Comité para el Manejo de Plagas de las Fuerzas Armadas de los EEUU (AFPMB) y sus socios en la industria, la Organización Mundial de la Salud y la Fundación Bill y Melinda Gates y otros. Palabras clave: Aplicación de insecticidas, rociamiento residual intradomiciliario, tecnología de próxima generación.

□ BHATT S.^{1*}, WEISS D. J.^{1*}, CAMERON E.^{1*}, BISANZIO D.¹, MAPPIN B.¹, DALRYMPLE U.¹, BATTLE K. E.¹, MOYES C. L.¹, HENRY A.¹, ECKHOFF P. A.², WENGER E. A.², BRIËT O.^{3,4}, PENNY M. A.^{3,4}, SMITH T. A.^{3,4}, BENNETT A.⁵, YUKITH J.⁶, EISELE T. P.⁶, GRIFFIN J. T.⁷, FERGUS C. A.⁸, LYNCH M. ⁸, LINDGREN F.⁹, COHEN J. M.¹⁰, MURRAY C. L. J.¹¹, SMITH D. L.^{1,11,12,13}, HAY S. I.^{11,13,14}, CIBULSKYS R. E.⁸ & GETHING P. W.¹ (2015). **The effects of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015** (*Los efectos del control de la malaria sobre Plasmodium falciparum entre el año 2000 y el 2015.*) *Nature* **15**: 535. doi: 10.1038

¹Spatial Ecology and Epidemiology Group, Timbergen Building, Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, UK. ²Institute for Disease Modeling Intellectual Ventures, 1555 132nd Avenue NE, Bellevue, Washington 98005, USA. ³Epidemiology and Public Health, Swiss Tropical and Public Health Institute, 4002 Basel, Switzerland. ⁴University of Basel, Petersplatz 1, 4001 Basel Switzerland. ⁵Malaria Elimination Initiative, University of California, San Francisco, 500 Parnassus Avenue, San Francisco, California 94143, USA. ⁶Center For Applied Malaria research and Evaluation, Tulane University School of Public Health and Tropical Medicine, 1440 Canal Street, Suite 2200 New Orleans, Louisiana 70112, USA. ⁷MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling, Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London W2 1PG, UK. ⁸Global Malaria Programme, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland. ⁹Department of Mathematical Sciences, University of Bath, Claverton Down,

Bath BA2 7AY, UK. ¹⁰Clinton Health Access Initiative, Boston, Massachusetts 02127, USA. ¹¹Institute for Health Metrics and Evaluation, University of Washington, Seattle, Washington 98121, USA. ¹²Sanaria Institute for Global Health and Tropical Medicine, Rockville, Maryland 20850, USA. ¹³Fogarty International Center, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20892-2220, USA. ¹⁴Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford OX3 7BN, UK. *These authors contributed equally to this work.

Desde el año 2000, una campaña concertada contra la malaria ha conducido a niveles sin precedentes en la cobertura de control vectorial en la región África sub - Sahariana. Comprendiendo el efecto de este esfuerzo, es vital informar futuras planificaciones del mismo. Sin embargo, el efecto de las intervenciones en malaria en las variadas situaciones epidemiológicas de África siguen sin entenderse debido a la ausencia de datos de vigilancia confiables y a los enfoques simplistas subyacentes a las corrientes estimaciones de enfermedades. Aquí organizamos una gran base de datos mediante encuestas de campo de malaria, con detalladas reconstrucciones de los cambios en las coberturas de intervención, para evaluar directamente las tendencias desde el año 2000 al 2015, y cuantificar los efectos atribuibles a los esfuerzos de control vectorial. Encontramos que la prevalencia de las infecciones por *Plasmodium falciparum* en África endémica, se redujo a la mitad y la incidencia de la enfermedad clínica se redujo en un 40% entre 2000-2015. Estimamos que las intervenciones han evitado 663 millones de casos clínicos desde el año 2000, con un intervalo de credibilidad de 642-753. Los mosquiteros impregnados con insecticidas y las más extendidas intervenciones, fueron sin duda los mayores contribuyentes (68% de casos prevenidos). Aunque todavía por debajo del nivel deseado, las últimas intervenciones en malaria han reducido sustancialmente la incidencia de la enfermedad en todo el continente. Aumentar el acceso a estas intervenciones, y el mantener su eficacia frente a la resistencia a las drogas y a los insecticidas, debe constituir la piedra angular de las estrategias de control, posteriores al año 2015.

□ ALIMI T.O., FULLER D.O., QUIÑONES M.L., XUE R.D., HERRERA S.V., AREVALO HERRERA M., ULRICH J.N., QUALS W.A. & BEIER J.C. (2015). **Prospects and recommendations for risk mapping to improve strategies for effective malaria vector control interventions in Latin America** (*Prospectos y recomendaciones para mapeo de riesgo para mejorar estrategias de intervenciones efectivas en el control*

vectorial de malaria en América Latina). *Malaria Journal* **14**: 519. doi: 10.1186/s12936-015-1052-1.

Abess Center for Ecosystem Science and Policy, University of Miami, Coral Gables, FL, USA

Con el control de malaria firmemente establecido en la mayoría de los países de América Latina y un número creciente de esos países en la fase de pre-eliminación, parece factible la eliminación de la malaria. La revisión de la literatura indica que la eliminación de malaria en esta región será difícil sin el diseño de estrategias locales para el control de vectores, lo cual depende en incrementar las investigaciones en ecología de vectores, respuestas genéticas y conductuales a cambios ambientales, como los causados por alteraciones de la cobertura vegetal y movimientos de poblaciones humanas. Una manera esencial de conectar las brechas en el conocimiento y mejorar el control de vectores es mediante el mapeo del riesgo. Los mapas de riesgos de malaria basados en el modelaje estadístico y de conocimientos pueden elucidar las relaciones entre factores ambientales y vectores de malaria, explicar las interacciones entre cambios ambientales y dinámica de vectores, y suministrar un heurístico para demostrar como el ambiente modela la transmisión de malaria. Para incrementar la utilidad de los mapas de riesgos en guiar las actividades de control de vectores, es preciso estandarizar las definiciones de riesgo de malaria. Los mapas además deben poseer la escala y resoluciones apropiadas a fin de convertirse en herramientas esenciales en el manejo integrado de vectores (MIV), de manera tal que los planificadores puedan identificar las áreas prioritarias que requieren de medidas de control. La completa integración de mapas de riesgos en los programas de control vectorial hará que las intervenciones estén basadas en evidencias, haciendo que la eliminación de malaria sea alcanzable.

□ DUNN J. C.^{1,2*}, GOODMAN S. J.¹, BENTON T. G.¹ & HAMER K. C.¹ (2013). **Infección de parásitos sanguíneos aviares durante la temporada no reproductiva: ¿Un tema pasado por alto en el declive de poblaciones?** (*Avian blood parasite infection during the non-breeding season: an overlooked issue in declining populations*). *J. Parasitol.* **100(3)**: 260-266. ISSN 0022-3395.

¹School of Biology, Irene Manton Building, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK. ²Centre for Conservation Science, Royal Society for the Protection of Birds, The Lodge, Sandy, Bedfordshire SG19 2DL, UK. *e-mail: jenny.dunn@rspb.org.uk

Los agentes patógenos y parásitos pueden tener un gran impacto en la dinámica de poblaciones hospedadoras, tanto en la mortalidad directa como

efectos indirectos. Ambos tipos de efectos pueden ser más fuertes en poblaciones que ya estén bajo presión. Hemos investigado el potencial de impacto de los parásitos sanguíneos sobre el estado inmunológico, parasitológico y el nivel de poblaciones de hospedadores durante la temporada no reproductiva utilizando la disminución de los Martillos amarillos (*Emberiza citrinella*) como modelo. Los Martillo amarillos infectados por *Haemoproteus* spp. mostraron una reducción de la relación de heterofilos y linfocitos (HL) y el conteo de leucocitos comparado con las aves no infectadas, indicando una respuesta inmunológica a la infección. Las alas de las aves durante el primer invierno de muestreo eran más cortas en comparación con la de las no infectadas, no presentándose la misma situación durante el segundo invierno más frío, el

análisis de supervivencia de 321 aves muestreadas a través de cuatro inviernos indicó que el aumento de la longitud del ala confiere una ventaja de supervivencia. Sugerimos que el impacto potencial de los parásitos sanguíneos pudo haber sido sobreestimado. Las investigaciones futuras deberían considerar los impactos potenciales de infecciones parasitarias subclínicas en la dinámica de las poblaciones vulnerables, y sugerir el uso de disminución de las poblaciones como sistemas modelo en el que investigar estas relaciones, así como el examen de las interacciones entre la enfermedad subclínica y otros factores de estrés ambientales. Palabras clave: Enfermedad subclínica, Parásito, ecología, aves de cría, Disminución de poblaciones, *Emberiza citrinella*, *Haemoproteus*.

Noticias



□ El Congreso Venezolano de Entomología (CVE) es promovido por la Sociedad Venezolana de Entomología (SVE) y reúne cada dos años a Profesores, Estudiantes, Investigadores Nacionales e Internacionales para divulgar asuntos relacionados con artrópodos: insectos, arácnidos y ácaros. En esta oportunidad el CVE se realizó en el marco de la conmemoración de los 50 años de la fundación de la SVE y rindió homenaje a los profesores Francisco Díaz y José Morales de la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA), por su destacada labor docente y de investigación en el campo de la Entomología. El XXIV CVE “Profesores Francisco Díaz y José Morales”, tuvo como sede el Auditorio “Ambrosio Oropeza” de la UCLA en Barquisimeto estado Lara, del 6 al 10 de Julio de 2015. El Comité Organizador del evento programó la asistencia de conferencistas nacionales e internacionales con altos estándares de calidad científica permitiendo a los participantes intercambiar conocimientos en las diversas áreas temáticas. Durante la convocatoria del evento fueron recibidos 118 trabajos nacionales e internacionales para ser presentados en las modalidades de simposio, conferencias, mesa redonda, carteles y orales, abarcando las áreas de: Aracnología y Acarología, Biología, Fisiología, Genética y Comportamiento, Control químico y biológico de insectos, Manejo integrado de plagas, Ecología y Diversidad, Entomología médica, Forense, Social y Veterinaria y Morfología, Taxonomía, Sistemática, Filogenia y Biogeografía. Sin lugar es un testimonio para la posteridad y una importante contribución a la divulgación del quehacer científico de nuestros investigadores comprometidos con el conocimiento universal.

Evelin Arcaya

Universidad Centro Occidental
Lisandro Alvarado (UCLA)
Presidente del XXIV Congreso Venezolano de Entomología.

□ Con gran satisfacción, la Sociedad Entomológica de Brasil (SEB) y Embrapa Mesetas Costeras presentan a ustedes el XXVI Congreso Brasileño de Entomología (XXVI CBE) / IX Congreso Latinoamericano de Entomología (IX CLE), que tendrán lugar en el Centro Cultural y de Exposiciones Ruth Cardoso, en Maceió, Alagoas, Brasil, entre el 13 y 17 de marzo del 2016. Estos dos Congresos, que son los principales foros de discusión sobre Entomología en toda América Latina, están juntos por segunda vez en la historia. Con esta integración, nuestro objetivo es ofrecer una oportunidad única para la interacción, la discusión y el intercambio de conocimientos y experiencias entre todos los entomólogos de América Latina, así como los participantes de las diversas partes del mundo. El Centro Cultural y de Exposiciones Ruth Cardoso cuenta con instalaciones amplias y modernas, proporcionando a los congresistas y expositores toda la infraestructura y comodidad necesaria para que disfruten de nuestro programa científico amplio, que consistirá de simposios, mesas redondas, conferencias, presentaciones de trabajos orales y carteles, concurso de fotos, Entomoquiz, y más. La ciudad de Maceió, con sus hermosas playas de aguas cálidas, exuberantes paisajes naturales, y rica gastronomía, hará que su participación en el Congreso sea una experiencia inolvidable. Le invitamos a asistir y disfrutar de esta importante reunión científica. En marzo del 2016, Maceió te espera!

Elio Cesar Guzzo

Investigador de Embrapa Mesetas Costeras
Presidente del XXVI CBE / IX CLE

INDICE ACUMULADO POR AUTORES, Vol. LV, 2015

A

Angulo Silva V. M.: 86
Arias L.: 109
Arregui G.: 132
Arrivillaga J.: 19

B

Bastidas Beltrán D.: 173
Benítez-Ortiz W.: 132
Bevilacqua M.: 155
Bolívar A. M.: 105
Bueno-Villegas J.: 199

C

Cárdenas L.: 155
Carrozza M.: 165
Caura S.: 109
Cazorla Perfetti D.: 184
Correia A.: 1
Cupul-Magaña F. G.: 199

D

Díaz A.: 94
Díaz M. T.: 94
Domínguez J.: 155

E

Enriquez S.: 132
Escobedo-Galván A. H.: 199
Espino C.: 69
Estrada Y.: 109

F

Ferrer E.: 41
Figueroa Acosta L.: 173
Flores K.: 165
Florez Martínez M.: 86
Frontado H.: 194

G

Gárate T.: 41
Garrido O.: 41
Gómez Martínez E.: 94
Gonzalez J.: 194
Golczer G.: 19

Guilarte Del V.: 94
Grillet M. E.: 194
Guzmán H.: 109

H

Henriquez A.: 94
Herrera F.: 69, 165

M

Marcano L.: 1
Martínez Á.: 52, 117
Martínez M.: 69
Mazzarri M.: 69
Menare C.: 194
Méndez Y.: 165
Mijares V.: 69
Molina P. de Fernández D.: 165, 173
Mora W.: 105
Morales L. G.: 155
Morales P.: 184
Moreno N.: 69
Moreno J. E.: 52, 117

N

Navarro J. C.: 132
Navarro E.: 194
Navas P.: 184
Nieves M.: 94

P

Pérez Pinto E.: 173

R

Rojas E.: 69
Rojas Rodríguez J. L.: 86
Rubio-Palis Y.: 52, 109, 117

S

Sánchez V.: 52, 109, 117
Simoni Z.: 94

T

Terán-Flores H.: 199
Toledo J.: 94

INDICE ACUMULADO POR MATERIA, Vol. LV, 2015

PARASITOLOGÍA

- Análisis de secuencias de moléculas de *Taenia solium* procesadas post-transcripcionalmente mediante transplicing (**Garrido O. et al.**) 41
- Hallazgo de *Hepatozoon* y otros hemotrópicos en caninos domésticos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela (**Martínez E. et al.**) 94
- Aislamiento de parásitos intestinales en la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) en Coro, estado Falcón, Venezuela (**Cazorla D. et al.**) 184

EPIDEMIOLOGÍA

- Miasis cutánea furuncular por *Dermatobia hominis* en Mérida, Venezuela. Reporte de caso (**Bolívar A. & Mora W.**) 105
- Conocimientos, actitudes y prácticas sobre dengue y su relación con hábitats del vector en Aragua-Venezuela (**Martínez M. et al.**) 69
- Intervención educativa para modificar conocimientos, actitudes y prácticas sobre la malaria en escolares indígenas Ye'kwana (**Bevilacqua M. et al.**) 155
- Mordedura de ciempiés (Chilopoda) en humanos: un registro de cuatro casos en México (**Cupul-Magaña F. et al.**) 199

ENTOMOLOGÍA

- Fluctuación poblacional y hábitat larval de anofelinos en el municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela (**Moreno J. et al.**) 52
- Caracterización de hábitats larvales de anofelinos en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela (**Moreno J. et al.**) 119
- Use and trends of molecular markers in sandflies (Diptera: Psychodidae). (**Golczer G. & Arrivillaga J.**) 19
- Primer reporte de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar e implicaciones epidemiológicas (**Rubio-Palis Y. et al.**) 52
- Persistencia en la competencia vectorial de *Aedes albopictus* de Venezuela a una cepa asiática dengue 2 (**Méndez Y. et al.**) 165

Taxonomía molecular de *Anopheles* del Ecuador mediante ADN mitocondrial (Citocromo c Oxidasa I) y optimización por Parsimonia Máxima (**Arregui G. et al.**) 132

Inventario preliminar de anofelinos (Diptera: Culicidae) en áreas endémicas de malaria, municipios Atures y Autana, estado Amazonas, Venezuela (**Navarro E. et al.**) 194

CONTROL

Estado de la resistencia a insecticidas organosintéticos de *Aedes aegypti* de Coro, estado Falcón, Venezuela (**Bastidas Beltrán D. et al.**) 173

SALUD AMBIENTAL

Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales. Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional (**Correia A. & Marcano L.**) 1



LISTA DE ÁRBITROS

El Comité Editorial del *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* agradece su valiosa colaboración a los Árbitros del Vol. LV, 2015

- Adriana Flores Suárez.** Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Albeiro Pérez Doria.** Grupo de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Sucre, Colombia.
- Anibal Bar.** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina
- César Raziel Lucio Palacio.** Pronatura Veracruz, México.
- Claudio Jiménez Cartagena.** Corporación Universitaria Lasallista (Facultad de Ingeniería). Antioquia-Colombia.
- Diego Rodriguez.** Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Eglee L. Zent.** Laboratorio de Ecología Humana, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). San Antonio de Los Altos, estado Miranda. Venezuela.
- Fernanda Zanca.** Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), (CONICET CCT-La Plata-UNLP). La Plata, Argentina.
- Fernando Saume Romero.** Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, Instituto de Química Agrícola. Maracay Aragua, Venezuela.
- Herakles Antonio Garcia Pérez.** Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Parasitología. Caracas, Distrito Capital. Venezuela.
- Jan Conn.** Escuela de Salud Pública. Centro de Enfermedades Zoonóticas, USA.
- José Alejandro Martínez Ibarra.** Área de Entomología Médica. Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara. México.
- José Luis Ramirez.** Instituto de Biología Experimental (IBE). Laboratorio de Genética Molecular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Distrito Capital. Venezuela.
- Juan Carlos Navarro.** Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela / Centro Internacional de Zoonosis. Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Julián García Rejón.** Universidad de Yucatán, Mérida. México.
- Larissa Dorina López Cepeda.** Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” Servicios de Salud Pública del Distrito Federal. México
- Luis Pérez Ibarra.** Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud. Maracay, estado Aragua. Venezuela.
- María Dalila Forlano.** Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Barquisimeto estado Lara, Venezuela
- María Eugenia Grillet.** Instituto de Zoología Tropical. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Distrito Capital. Venezuela.
- Martha Lucia Quiñones.** Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Mayira Sojo Milano.** Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). Dirección General de Contraloría Sanitaria. Maracay, estado Aragua. Venezuela.
- Nereida Delgado Puchi.** Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua. Venezuela.
- Nora Beatriz Camino.** Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). La Plata, Argentina.
- Noris Rodriguez.** Instituto de Biomedicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Distrito Capital. Venezuela.
- Omar Verde.** Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay, estado Aragua. Venezuela.
- Richard Hoyos López.** Corporación Universidad Del Sinu - Elias Bechara Zainúm - Unisinu, Cartagena. Colombia.
- Roberto H. Mengarelli.** Servicio de Cicatrización de Heridas, Hospital Municipal de Tigre. Provincia de Buenos Aires. Argentina.

Verónica Carvajal de la Fuente. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.

Victor Olano. Instituto Nacional de Salud. Bogota, Colombia

Yadira Rangel. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Instituto de Zoología Tropical, Caracas, Distrito Capital. Venezuela.

Yasmín Rubio-Palis. Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud. Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED). Maracay, estado Aragua. Venezuela.

Zoraida Fernández. Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), Brasil.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL GUÍA PARA LOS AUTORES

Presentación y redacción

Las contribuciones deben ser inéditas, escritas en español, inglés o portugués.

Cada trabajo se acompañará de una declaración firmada por el autor de correspondencia, en la que se especifique que no ha sido publicado previamente, que no se presentará en otra revista antes de conocer la decisión de publicación del Boletín y que el manuscrito ha sido leído y aprobado por todos los autores. Se deberá usar caracteres de estilo Times New Roman o Arial que midan 12 puntos. Todos los márgenes serán de una pulgada (2,4 cm).

La primera página debe incluir el título del trabajo, breve y específico, con máximo de 15 palabras, a continuación los nombres y los apellidos completos de todos los autores, nombre de la institución a la cual pertenecen y la dirección postal. Indicar el autor de correspondencia y su dirección electrónica.

Todos los artículos tendrán título y resumen en español e inglés. Es necesario también un título corto para su inclusión en el encabezado de las páginas pares. Los resúmenes, con un máximo de 15 –20 líneas, son contentivos de los aspectos más relevantes y principales conclusiones del trabajo. No deben utilizarse en los resúmenes abreviaturas, referencias o notas a pie de página. Al pie del resumen se incluirá una lista de 3 hasta 5 palabras claves, en español e inglés, que reflejen el contenido del documento. Se utilizarán como palabras claves únicamente aquellas que son aceptadas por bases de datos internacionales, las cuales pueden ser consultadas en las siguientes direcciones:

Palabras claves (Español): <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>
Key Words (Inglés): <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>

En el texto de los artículos originales se deberá seguir el siguiente orden: Resumen en español, Introducción, Materiales y métodos, Consideraciones Éticas, Resultados, Discusión, Conflicto de Intereses, Agradecimientos, Título y Resumen en inglés, Referencias y Anexos (Tablas y Figuras) en hojas aparte.

En las investigaciones en humanos, animales y el ambiente, deben ser tomados en consideración acuerdos internacionales sobre los aspectos éticos, por tanto debe ser expresamente citada en el trabajo la revisión y aprobación por un Comité de Bioética debidamente identificado.

Los artículos incluirán en los Agradecimientos, los apoyos recibidos de instituciones públicas o privadas para la realización del estudio, así como las relaciones personales o institucionales que han contribuido en la obtención y análisis de los resultados.

Para las referencias bibliográficas citadas en el texto se utilizará el nombre del autor y el año de la publicación entre paréntesis.

Ejemplo: (Scorza, 1988)

Si se trata de dos autores, ambos serán citados.

Ejemplo: (Scorza & Rojas, 1990)

Cuando son más de dos autores, se citará el nombre del primer autor, seguido por *et al.*, y el año correspondiente de la publicación.

Ejemplo: (Scorza *et al.*, 1988)

En el caso que los autores sean sujeto de la oración, solamente el año se escribirá entre paréntesis .

Ejemplo: Scorza *et al.* (1999) demostraron que.....

Referencias bibliográficas

1. Revisiones, Artículos Originales y Reportes Epidemiológicos:

La presentación de las referencias bibliográficas, se hará en orden alfabético y de acuerdo a las siguientes normas:

- *Revistas o publicaciones periódicas:* apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s), (año), título del artículo, abreviatura de la revista (en cursiva), volumen (en negrita) y número de las páginas.

Ejemplo:

Scorza J. V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. Soluciones. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **30:** 1-6.

Cuando se trata de seis ó más autores, figurarán los apellidos e iniciales de los primeros 6 y se añadirá la expresión *et al.*

Si el trabajo es publicado en un Suplemento debe citarse.

Ejemplo:

Bonfante G. R., Urdaneta I., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldivia M. E. *et al.* (1995). Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35 (Supl. 1):** 53-62.

- *Libros:* apellido (s) del autor (es), inicial (es) del nombre (s), (año), título del libro, ediciones, casa editora y lugar de publicación (ciudad, país).

Ejemplo:

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones.* 2ª edición. Ed. Sobre Visión CA. Caracas, Venezuela.

- *Capítulo de un libro:* apellido (s) del autor (es), inicial (es) del nombre (s), (año), título del capítulo. página (s). En: Título del libro (en cursiva), apellido (s) e inicial (es) del editor del libro, edición, casa editora, lugar de publicación (ciudad), país.

Ejemplo:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. En: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction.* Eds. Bertelli A. & Houck J. C. 2ª ed. Excerta Med. London, U.K.

- *Tesis de grado no publicada:* apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). título (en cursiva). tesis de maestría o tesis doctoral. universidad. ciudad, país.

Ejemplo:

Solís T. A.(2000). *Diagnóstico de la resistencia a insecticidas en cepas de Ae. aegypti (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de República Dominicana.* Trabajo de grado de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

- *Trabajo presentado en Congreso:* apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). título (en cursiva). nombre del congreso. ciudad, país.

Ejemplo:

Delgado O., Blanca I., Silva S., Coraspe V., Perez A. & Marquez M. E. (1999). *Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Toxocariasis.* XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México.

- *Documento en línea*: apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). título (en cursiva). documento en línea: <http://www.ejemplo.com> (consultado: año, mes, día).

Ejemplo:

Moreno Landera L. A. & Gutierrez Delgado J. A. (2001). *Remedios y creencias de medicina popular en la Merindad de Campoo*. Documento en línea: http://www.vacarizu.es/Cuadernos/Cuaderno_26/Remedios_y_creencias.htm (Consultado: 2008, Diciembre 22).

2. Notas Científicas:

Las referencias bibliográficas deben ser incluidas en el texto, citándose, hasta dos autores: (apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). revista (en cursiva). volumen (en negrita) y número de las páginas). Cuando son más de dos autores: (apellido del primer autor, inicial del nombre (s) *et al.* (en cursiva) (año). revista (en cursiva). volumen (en negrita) y número de las páginas).

Ejemplo: (Barrera *et al.*, 1979. *Acta Cient. Venez.* **30**: 418–424).

Citas tales como “datos no publicados” y “comunicación personal” no deben ser incluidas en la lista de referencias, serán incluidas en el texto (en cursiva). En relación a Trabajos en prensa, sólo pueden ser colocados en la lista de referencias, artículos ya aceptados y se citará la revista.

Los autores deben ajustarse al contenido de los Códigos de Nomenclatura Internacional y al Sistema de Medidas Internacionales (SI). Este último se basa en el sistema métrico decimal según el cual los símbolos de las unidades no toman la terminación del plural (5 km y no 5 kms) ni van seguidos de punto (10 mL y no 10 mL.).

Tablas y Figuras

Las tablas y figuras, deben estar referidas oportunamente en el texto y serán debidamente identificadas con el número en el orden correlativo, títulos, fuentes (cuando sea necesario) y leyendas.

Las figuras se presentarán utilizando símbolos claros que permitan identificar puntos que requieran ser resaltados o reducidos. Se identificarán con su número y en hojas apartes se presentarán las leyendas correspondientes.

Las fotografías o imágenes deben ser escaneadas o digitalizadas a una resolución no menor a 300 dpi y guardadas bajo el formato o extensión JPG; de no poder cumplir con estos requerimientos enviar original de la fotografía o imagen con su debida protección o sobrecubierta. En casos especiales se considerará la posibilidad de la publicación de las figuras, fotografías o imágenes en color.

En el caso de las microfotografías y dibujos, tratar de la misma manera que las fotografías e imágenes y señalar el aumento o escala correspondiente. En relación a Mapas y Planos, cada uno en una hoja aparte con su leyenda correspondiente en un formato de 11,3 x 18,4 cms. como máximo.

La extensión de los artículos no debe ser mayor de 20 páginas en papel tamaño carta (28 x 21,5 cm), escritas a doble espacio.

Envío de los artículos

Los trabajos deben ser enviados a los editores del Boletín preferiblemente por vía electrónica (bolmal2012@gmail.com) o por correo aéreo o terrestre en sobre contentivo de la carta dirigida a los Editores y el artículo en un CD en lenguajes compatibles con Microsoft® Windows®, con original y una (1) copia.

Igualmente, para el envío de toda correspondencia relacionada o solicitando constancias, referencias, sugerencias, observaciones y otros deberán dirigirse a la atención al Editor, por correo especial a la dirección:

Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
Av. Bermúdez Sur, Maracay, Edo. Aragua -Venezuela.
Teléfonos: (58-0243) 2325633 / 2320833 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bolmal2015@gmail.com

Sobre el arbitraje y la aceptación de los artículos

Los trabajos sometidos para publicación en el Boletín de Malariología y Salud Ambiental serán sometido a un proceso de revisión y arbitraje. El plazo para la respuesta a los autores dependerá de la complejidad del tema y de la disponibilidad de los especialistas en el área.

En una primera revisión el Comité Editorial seleccionará los artículos con base en los criterios generales y objetivos de la revista. Seguidamente el artículo es enviado a dos (2) especialistas en el área específica. Los Editores y el Comité Editorial estarán atentos a los posibles conflictos de interés que puedan inhabilitar los árbitros para evaluar un determinado manuscrito.

Estos examinarán la calidad científica del manuscrito independientemente y emitirán su opinión razonada, recomendando o no la aceptación del artículo para la publicación. El trabajo con las observaciones y sugerencias de los árbitros será devuelto al Autor de correspondencia quien deberá enviar la nueva versión con una explicación detallada sobre los cambios efectuados, acatando las recomendaciones o, de no aceptarlas, argumentando las razones del porqué no las aceptan.

Es competencia del Comité Editorial la decisión final acerca de la publicación del artículo, una vez que haya verificado el cumplimiento de las condiciones señaladas y analizado la respuesta de los autores.

Toda decisión se comunicará por escrito al Autor de correspondencia con la mayor rapidez posible.

Después del arbitraje, los manuscritos se someterán a un procesamiento editorial que puede incluir, en caso necesario, su condensación y la supresión o adición de cuadros, ilustraciones y anexos. La versión editada (prueba de imprenta) se remitirá al Autor principal para su revisión y aprobación y para que conteste cualquier pregunta adicional del editor.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental se reserva todos los derechos legales de los manuscritos aprobados para su publicación, así como el derecho de hacer los ajustes y cambios que aseguren la calidad de la publicación. Sin embargo, no se hace responsable de los conceptos u opiniones expresados en el trabajo. Los originales no se devolverán en ningún caso.

Los Editores, el Comité Editorial y los árbitros se declaran formalmente no autorizados para utilizar con fines privados o particulares, la información obtenida a través de la revisión de los manuscritos. Así mismo, se respetará el derecho a la confidencialidad de los revisores y editores.

Una vez publicado el trabajo, el autor de correspondencia recibirá vía e-mail la versión PDF.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Apresentação e redação

As contribuições devem ser inéditas, escritas em espanhol, inglês ou português.

Cada trabalho deve ser acompanhado de duas declarações assinadas pelo autor indicado para correspondência, nas quais seja especificado que o trabalho não foi publicado previamente, e que o mesmo não será apresentado em outra revista antes que seja conhecida a decisão do Boletim e ainda que o manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores.

Deve ser utilizada fonte estilo Times New Roman ou Arial tamanho 12. Todas as margens devem medir 2,4 cm.

A primeira página deve incluir (1) o título do trabalho, breve e específico, com o máximo de 15 palavras, (2) o nome completo de todos os autores, (3) nome da(s) instituição(ões) de origem, cidade, estado, país e (4) endereço para correspondência e e-mail do autor principal.

Todos os artigos devem conter título e resumo em espanhol e inglês. É necessário também um título resumido para inclusão no cabeçalho das páginas pares. Os resumos não devem ultrapassar 15-20 linhas, devendo conter os aspectos mais relevantes e as principais conclusões do trabalho. Não devem ser incluídos no resumo abreviaturas, referências ou notas de rodapé. Ao final devem ser incluídas 3 a 5 palavras-chave em espanhol e inglês. Usar obrigatoriamente termos do "Medical Subject Headings, do Index Medicus" (podem ser consultados na página eletrônica: www.decs.bvs.br para termos em português, espanhol e inglês ou a página eletrônica: www.nlm.nih.gov/mesh para termos somente em inglês).

O texto dos artigos originais deverão seguir a seguinte ordem: resumo em português, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, título e resumo em inglês, referências e anexos (tabelas e figuras) em folhas a parte.

Nas investigações com seres humanos, animais e ambiente, devem ser considerados os acordos internacionais sobre os aspectos éticos, sendo expressamente citada a revisão e aprovação por um comitê de ética devidamente identificado.

Os artigos devem incluir nos agradecimentos os apoios recebidos de instituições públicas ou privadas para a realização do estudo, assim como as relações pessoais ou institucionais que tenham contribuído para a obtenção ou análise dos resultados.

Para as referências bibliográficas citadas no texto deve ser utilizado apenas o nome do autor e o ano da publicação entre parênteses. **Exemplo:** (Scorza, 1988).

No caso de dois autores, ambos serão citados.

Exemplo: (Scorza & Rojas, 1990).

Quando são mais de dois autores, será citado o nome do primeiro autor, seguido por *et al.*, e o ano correspondente a publicação. **Exemplo:** (Scorza *et al.*, 1988).

No caso em que os autores são sujeito da oração, apenas o ano virá entre parênteses. **Exemplo:** Scorza *et al.* (1999) demonstraram...

Referências

1. *Revisão, Artigos Originales y Relatórios Epidemiológicos:*

Deve ser feitas em ordem alfabética e de acordo as seguintes normas:

- *Revistas ou publicações periódicas:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano), título do artigo, abreviatura da revista (em itálico), volume da revista (em negrito) e número das páginas.

Exemplo:

Scorza J. V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. *Soluciones. Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **30:** 1-6.

Quando se trata de 6 ou mais autores, especifica-se os sobrenomes e iniciais dos 6 primeiros e se utiliza a expressão *et al.*

Se o trabalho citado é proveniente de suplemento deve-se especificar.

Exemplo:

Bonfante G. R., Urdaneta I., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldivia M. E. *et al.* (1995). Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35 (Supl. 1):** 53-62.

- *Livros:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano), título do livro, número da edição, editora, lugar da publicação (cidade, país).

Exemplo:

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones.* 2ª edición. Ed. Sobre Visión C.A. Caracas, Venezuela.

- *Capítulo de livro:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano), título do capítulo. Páginas. Em: título do livro (em itálico), sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), número da edição, editora, lugar da publicação (cidade, país).

Exemplo:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. En: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction.* Eds. Bertelli A. & Houck J. C. 2ª ed. Excerta Med. London, U.K.

- *Tese de grado não publicada:* sobrenome do autor, iniciais do (s) nome (s), (ano). título (em itálico). tese de mestre ou doutorado, universidade. cidade, país.

Exemplo:

Solís T. A. (2000). *Diagnóstico de la resistencia a insecticidas en cepas de Ae. aegypti (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de República Dominicana.* Trabajo de grado de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

- *Trabalho apresentado no Congresso:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano). título (em itálico). nome do congresso. cidade, país.

Exemplo:

Delgado O., Blanca I., Silva S., Coraspe V., Perez A. & Marquez M. E. (1999). *Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Toxocariasis.* XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México.

- *Documento "on-line"*: sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano). título (em itálico). documento on-line: <http://www.exemplo.com> (consultado: ano, mês, dia).

Exemplo:

Moreno Landera L. A. & Gutierrez Delgado J. A. (2001). *Remedios y creencias de medicina popular en la Merindad de Campo*. Documento en línea: http://www.vacarizu.es/Cuadernos/Cuaderno_26/Remedios_y_creencias.htm (Consultado: 2008, Diciembre 22).

2. Notas Científicas:

As referências devem ser incluídas no texto quando um ou dois autores, citando: sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano). revista (em itálico). volume (negrito) e número de páginas). Quando mais de dois autores: (primeiro sobrenome do autor, inicial do nome (s) *et al.* (em itálico) (ano). revista (em itálico). volume (negrito) e número de páginas).

Ejemplo: (Barrera *et al.*, 1979. *Acta Cient. Venez.* **30**: 418–424).

Citações de dados não publicados ou de comunicações pessoais não devem ser incluídas na lista de referências, devem ser incluídas e especificadas no texto (em itálico). Em relação a trabalhos não publicados no prelo esses só podem ser colocados na lista de referências se forem artigos já aceitos, citando a revista.

Os autores devem seguir ao conteúdo dos Códigos de Nomenclatura Internacional e ao Sistema de Medidas Internacionais (SI). Esse último se baseia no sistema métrico decimal, segundo o qual os símbolos das unidades não assumem a terminação no plural (5 km e não 5 kms) nem são seguidos por pontos (10 mL e não 10 mL.)

Tabelas e Figuras

As tabelas e figuras devem estar referidas oportunamente no texto e serem devidamente identificadas com número, e em ordem, títulos, fontes (se necessário) e legendas.

As figuras devem ser apresentadas utilizando símbolos claros que permitam identificar pontos que necessitam ser destacados ou reduzidos. Devem ser identificadas com número e apresentadas em folhas a parte com as legendas correspondentes.

As fotografias ou imagens devem ser escaneadas ou digitalizadas em uma resolução igual ou superior a 300dpi e salvas no formato JPG; caso não seja possível cumprir esses requisitos pede-se enviar o original da fotografia ou imagem protegida ou envelope. Nos casos especiais será considerada a possibilidade da publicação das figuras, fotografias ou imagens em cores.

No caso de microfotografias e desenho, usar o mesmo procedimento recomendado para fotografias e imagens e indicar a ampliação ou escala correspondente. Em relação a mapas e planos, cada um deve ser colocado em uma folha à parte com a legenda correspondente com o formato máximo 11,3 x 18,4 cm.

A extensão dos artigos não deve ultrapassar 20 páginas em papel tamanho carta (28 x 21,5 cm), com espaço duplo.

Envio dos artigos

Os trabalhos devem ser enviados aos editores do Boletim preferencialmente por via eletrônica (bolmal2012@gmail.com) ou por correio, acompanhado de carta dirigida aos editores e o artigo impresso (original e cópia) além do arquivo em CD (em linguagem compatível com Microsoft®, Windows®).

Do mesmo modo, o envio de toda correspondência relacionada ou solicitação de declarações, referências, sugestões, observações e outros devem ser direcionadas aos cuidados do editor, por correio ao endereço:

Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
Av. Bermúdez Sur N° 93, Maracay, Edo. Aragua -Venezuela.
Teléfonos: (58-0243) 2325633 / 2320833 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bolmal2015@gmail.com

Sobre o julgamento e aceitação dos artigos

Os trabalhos submetidos para publicação no Boletim de Malariologia e Saúde Ambiental serão submetidos a um processo de revisão julgamento. O prazo para resposta aos autores dependerá da complexidade do tema e da disponibilidade dos especialistas na área.

Em uma primeira revisão o Comitê Editorial selecionará os artigos com base nos critérios gerais e objetivos da revista. E seguida o artigo é remetido a dois especialistas na área específica. Os editores e o Comitê Editorial estarão atentos aos possíveis conflitos de interesses que possam comprometer os pareceristas para a avaliação de determinado manuscrito.

Os pareceristas examinarão a qualidade científica do manuscrito independentemente e emitirão sua opinião justificada, recomendando ou não a aceitação do artigo para a publicação. O trabalho com as observações e sugestões dos pareceristas serão devolvidos ao autor indicado para correspondência, que deverá enviar a nova versão com o relato detalhado das alterações efetuadas, das recomendações acatadas e das recomendações não aceitas com respectiva argumentação.

Ao Comitê Editorial compete a decisão final acerca da publicação do artigo, uma vez que atendidas todas as condições indicadas e analisadas a resposta dos autores.

Toda decisão será comunicada por escrito ao autor da correspondência no menor prazo possível.

Após o julgamento, os manuscritos serão submetidos ao processo editorial que pode incluir, se necessário, a condensação e a supressão ou adição de quadros, ilustrações e anexos. A versão editada (prova de impressão) será remetida ao autor principal para sua revisão e aprovação, sendo necessária resposta a qualquer indagação adicional do editor.

Ao Boletim de Malariologia e Saúde Ambiental se reservam todos os direitos legais dos manuscritos aprovados para sua publicação, assim como o direito de fazer ajustes e modificações que assegurem a qualidade da publicação. Entretanto, não se responsabiliza por conceitos ou opiniões expressos no trabalho. Os originais não serão devolvidos em hipótese alguma.

Os editores, o Comitê Editorial e os pareceristas se declaram formalmente não autorizados a utilizar com fins privados ou particulares, a informação obtida através da revisão dos manuscritos. Além disso, serão respeitados os direitos a confidencialidade dos revisores e editores.

Uma vez publicado o trabalho o autor da correspondência receberá via e-mail a versão em PDF.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Style and format

Contributions should be unpublished and written in Spanish, English or Portuguese.

Each work should be accompanied by a signed declaration by the corresponding author in which he specifies that the work has not been previously published and that it has not been presented to another publication prior to a decision about publishing in the Bulletin of Malariology and Environmental Health and that the manuscript has been read and approved by all the authors. Font should be Times New Roman or Arial, 12 points. All margins should be 2.4 cm (0.9 inch).

The first page should include the title of the work, brief and specific, with a maximum of 15 words, the complete names of all the authors, the name of the institution for each author and the postal address. The corresponding author and his electronic address should be indicated.

All articles will have a title and abstract in Spanish and English. A short title is necessary for the running title in the headers of the even pages. The abstracts, with a maximum length of 15—20 lines, summarize the most relevant aspects and the principal conclusions of the work. Abbreviations or footnotes should not be used in the abstract. At the end of the abstract, there should be a list of 3 to 5 key words, in Spanish and English, which reflect the content of the document. Use only key words that are accepted by international data bases, which can be consulted at the following site:

Key words (Spanish): <http://decs.bvs.br/E/homepage.htm>

Key words (English): <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>

The text of articles should be in the following order: Abstract in Spanish, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgement, Title and Summary in English, References and Annexes (Tables and Figures on separate pages).

In investigations of humans, animals and the environment, consideration should be given to international accords on ethical aspects, which should be expressly cited the work with review and approval by a properly identified Bioethics Committee.

Articles will include in the Acknowledgement the support received from public or private institutions for completion of the study as well as the people or institutions which have contributed in the obtaining and analysis of the results.

For bibliographic references cited in the text, place the name of the author and the year of publication in parentheses: (**Scorza, 1988**)

Two-author citations are cited as follows:
(**Scorza & Rojas, 1990**)

When there are more than two authors, cite the name of the first author, followed by *et al.* and the year of publication of the cited reference; e.g. (**Scorza et al., 1988**)

In the event the authors may be the subject of a sentence, only the year is placed in parentheses; e.g. **Scorza et al. (1999)** demonstrated that....

References

1. Reviews, Original Articles and Epidemiological Reports:

Bibliographical references will be listed in alphabetical order in the following manner:

- *Journal or periodical publication*: name(s) of author(s), initial of the first name(s), (year), title of the article, abbreviated name of the journal in italics, volume in bold type, and the page numbering.

Example:

Scorza J. V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. Soluciones. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **30**: 1-6.

When there are 6 or more authors, list the names and initials of the first 6 and add *et al.* If the work is published in a supplement, this is to be cited.

Example:

Bonfante G. R., Urdaneta I., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldivia M. E. *et al.* (1995). Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35 (Supl. 1)**: 53-62.

- *Book*: List the name(s) of the author(s), initials of first name(s), (year), title of the book, edition, publishing house and place of publication (city and country). **Example:**

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones*. 2ª edición. Ed. Sobre Visión CA. Caracas, Venezuela.

- *Chapter in a book*: list the name(s) of author(s), initial(s) of first name(s), (year), title of the chapter, and page(s). Give book title (in italics), name(s) and initial(s) of the editor(s) of the book, the edition, the publishing house, and place of publication (city and country).

Example:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. En: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. Eds. Bertelli A. & Houck J. C. 2ª ed. Excerta Med. London, U.K.

- *Unpublished degree thesis*: name of author, initial(s) of first name(s), (year), title (in italic), degree thesis, university, city, country.

Example:

Solís T. A. (2000). *Diagnóstico de la resistencia a insecticidas en cepas de Ae. aegypti (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de República Dominicana*. Trabajo de grado de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

- *Paper presented at Congress*: List the name(s) of the author(s), initials of first name(s), (year), title (in italic), congress name, city, country.

Example:

Delgado O., Blanca I., Silva S., Coraspe V., Perez A. & Marquez M. E. (1999). *Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Toxocariasis*. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México

- *Document "on line"*: List the name(s) of the author(s), initials of first name(s), (year). title (in italics). document on line: <http://www.example.com> (downloaded: year, month, day).

Example:

Moreno Landera L. A. & Gutierrez Delgado J. A. (2001). *Remedios y creencias de medicina popular en la Merindad de Campoo*. Documento en línea: http://www.vacarizu.es/Cuadernos/Cuaderno_26/Remedios_y_creencias.htm (Consultado: 2008, Diciembre 22).

2. Scientific Notes:

References should be included in the text, citing for one or two authors: (name(s) of the author(s), initial of the name (s), (year). journal (in italics). volume (bold) and number of pages). If more than two authors: name of the first author, initials of first name(s) *et al.* (in italics) (year). title (in italics). journal (in italics). volume (bold) and number of the pages).

Example: (Barrera *et al.*, 1979. *Acta Cient. Venez.* **30**: 418–424).

Citations such as “no date of publication” and “personal communication” should not be included in the list of references and should be shown in the text in italics. Regarding works in press, only articles already accepted and cited in the article may be placed in the list of references.

Authors should arrange the content to conform to the Code of International Nomenclature and International System of Measurement (SI). This is based on the metric system in which units do not have plural endings (5 km not 5 kms) nor are they followed by periods (10 mL not 10 mL.).

Tables and Figures

Tables and figures should be referred to appropriately in the text and will be properly identified in correlative order: titles, sources (when necessary) and legends.

Presented figures will use clear symbols that need to be highlighted or reduced. They will be identified with their number, corresponding legends will be put on separate pages.

Photographs or pictures should be digitized or scanned with a resolution of no less than 300 dpi and saved in JPG format; if these requirements cannot be met, the photographs or pictures should be sent with appropriate protective cover. In special cases, the possibility of publishing photographs or pictures in color will be considered.

Microphotographs and drawings will be treated in the same manner as photographs and pictures and enlargement or scale indicated. Maps and plans should be on a separate page with their corresponding legend with a maximum size of 11.3 x 18.4 cm (4.45 x 7.25 inch).

Papers should be no longer than 20 pages on paper 28 x 21.5 cm (8.5 x 11 inch) as a maximum size.

Article submission

Preferably papers should be sent to the editors of the Bulletin electronically (bolmal2012@gmail.com) or by air or terrestrial mail in an envelope with a letter directed to the editors and with the article on a CD in language compatible with Microsoft® Windows® with the original and one (1) copy.

Likewise, all related correspondence or documentary proof, references, suggestions, remarks and other matters should be directed by mail to the editor at the following address:

Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
Av. Bermúdez Sur, Maracay, Ed. Aragua – Venezuela.
Telephone: (58-0243) 2325633 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bolmal2015@gmail.com

Review and acceptance of articles

Articles submitted for publication in the Bulletin of Malariology and Environmental Health will undergo a process of review and refereeing. The period for responding to authors will depend on the complexity of the paper and the availability of specialists in the field.

In the first review the Editorial Committee will select articles on the basis of the general criteria and objectives of the Bulletin. Next the article will be sent to two (2) specialists in the specified area. The editors and the Editorial Committee will seek to avoid possible conflicts of interest that could disqualify referees from evaluating a particular manuscript.

These specialists will evaluate the scientific quality of the manuscript and will submit their reasoned opinions, recommending, or not recommending, acceptance of the article for publication. The work with the observations and suggestions of the referees will be returned to the corresponding author who will send a new version with a detailed explanation of the changes made, accepting the recommendations or not and presenting the reasons for not accepting them.

The Editorial Committee has the final decision concerning the publication of the article once they have verified compliance with indicated conditions and have analyzed the response of the authors.

All decisions will be sent by letter to the corresponding author as quickly as possible.

After the review, manuscripts will be subject to an editorial process which may include, in the event it is necessary, its condensation and the deletion or addition of charts, illustrations and annexes. The edited version (galley proof) will be sent to the principal author for his review and approval and his reply to any additional questions from the editor.

The Bulletin of Malariology and Environmental Health reserves the legal rights to the manuscripts approved for its publication as well as the right to make adjustments or changes which will insure the quality of the publication. However, it is not responsible for the ideas or opinions expressed in the work. The originals will not be returned under any circumstances.

The editors, the Editorial Committee and the referees formally state they are not authorized to use for private or personal ends information obtained through review of the manuscripts. In the same way they will respect the right of confidentiality of the reviewers and editors.

Once the work is published, the corresponding author will receive by e-mail a PDF version.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

(ISSN-1690-4648)

(antes: Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una revista científica que publica artículos sobre diferentes aspectos de la Medicina Tropical (incluyendo patología, estudios clínicos, experimentales y terapéuticos, estudios sociales, epidemiología y control), Parasitología (protozoología, helmintología, entomología, malacología, bioquímica, inmunología, biología molecular, genética), Ingeniería Sanitaria y Salud Ambiental.

Es objetivo de la revista publicar nuevos conocimientos y metodologías para el entendimiento de la dinámica de la transmisión de enfermedades infecciosas virales y parasitarias y sus vectores, dentro de su contexto eco- y socio-epidemiológico, en apoyo y para el diseño y manejo oportuno de los programas de prevención y control y la salud ambiental.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una publicación periódica semestral con un (1) volumen y dos(2) números (Julio y Diciembre) por año, distribuida nacional e internacionalmente en formato impreso y en formato electrónico a través de la siguiente dirección de Internet: <http://www.iaes.edu.ve>

El Boletín está estructurado en nueve Secciones

- I.- Forum.** Discusión acerca de análisis de situaciones, programas, proyectos o intervenciones en salud.
 - II.- Revisiones** sobre los temas de competencia del Boletín.
 - III.- Artículos Originales.** Aportes inéditos en las áreas antes mencionadas de Medicina Tropical, Parasitología, Ingeniería Sanitaria, Salud Ambiental.
 - IV.- Reportes Epidemiológicos.** Actualización de los datos epidemiológicos sobre distribución geográfica y demográfica, prevalencia e incidencia.
 - V.- Notas Científicas y/o Tecnológicas.** Comunicaciones cortas sobre hallazgos y/o resultados preliminares, nuevas técnicas y metodologías.
 - VI.- El Hombre y la Ciencia.** Biografía de Científicos que se han destacado a nivel nacional y/o internacional en el área de la Salud y del Saneamiento Ambiental.
 - VII.- Revista de revistas.** Resúmenes de artículos publicados en otras revistas o de Trabajos Especiales de Grado.
 - VIII.- Cartas al Editor.** Comunicaciones dirigidas a la redacción relacionadas con tópicos de interés para difusión en el Boletín de Malariología.
 - IX.- Noticias.** Información sobre reuniones científicas nacionales e internacionales, Congresos, Simposios, Talleres y otros eventos relevantes.
-



Servicio Autónomo
Instituto de Altos Estudios
Dr. Arnaldo Gabaldon



Gobierno
Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la **Salud**

