

## Estatus taxonómico del vector de la malaria *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* (Neiva y Pinto) en Cáceres, Antioquia, Colombia

Taxonomic status of the malaria vector *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* (Neiva & Pinto) in Cáceres, Antioquia, Colombia

Paulina Gutiérrez-Arbeláez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2076-9581>

Wilber Gómez-Vargas<sup>2\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9790-7415>

Juan Fernando Ríos-Cadavid<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4562-7048>

John Freddy Ruiz-López<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8563-8799>

<sup>1</sup>Universidad CES. Colombia.

<sup>2</sup>Universidad CES, Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT-CES). Colombia.

<sup>3</sup>Universidad CES, Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT-CES), Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia. Colombia.

<sup>4</sup>Universidad de Antioquia, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales. Colombia.

\*Autor para la correspondencia: [wgomez@ces.edu.co](mailto:wgomez@ces.edu.co)

### RESUMEN

**Introducción:** *Anopheles triannulatus* es un complejo de especies de importancia en salud pública en Suramérica, debido a su papel como vector de la malaria en Brasil, Perú y Venezuela.

**Objetivo:** Dilucidar el estatus taxonómico del *An. triannulatus* en Cáceres, Antioquia, Colombia, con especímenes recolectados en la vereda Los Azules.

**Métodos:** Los especímenes se identificaron con claves morfológicas y, posteriormente, confirmados con la región código de barras (COI, ADNmt). Se

generó un árbol *Neighbor-Joining* con la matriz del modelo Kimura 2 parámetros-NJ-K2P.

**Resultados:** Se colectó un total de 251 mosquitos del género *Anopheles*; 233 fueron *An. triannulatus* s.l. y se encontraron cinco haplotipos (H1, H2, H3, H4 y H5).

**Conclusiones:** Mediante el empleo de la región código de barras (COI, ADNmt) se confirma que en Colombia el *An. triannulatus* es un complejo de especies con, al menos, tres linajes claramente identificados. Sin embargo, serán necesarios futuros estudios acerca de la morfología de adultos, estadios inmaduros, ecología y la utilización de otros marcadores moleculares para describir las especies presentes en este complejo.

**Palabras clave:** *Anopheles triannulatus*; código de barras; COI; Colombia.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Anopheles triannulatus* is a species complex of public health importance in South America, by its role as a secondary malaria vector in Brazil, Perú and Venezuela.

**Objective:** To elucidate the taxonomic status of *An. triannulatus* in Caceres, Antioquia, Colombia, with specimens collected in the village Los Azules.

**Methods:** The specimens were identified by morphological keys and DNA barcoding (COI, mtDNA). A Neighbor-Joining tree using Kimura-2-parameter (NJ-K2P) model was generated.

**Results:** A total of 251 mosquitoes of the genus *Anopheles* were collected, of which 233 were *An. triannulatus* with five haplotypes (H1, H2, H3, H4 and H5).

**Conclusion:** Using the DNA barcoding region, we confirmed that *An. triannulatus* is a species complex in Colombia, with at least three lineages. However, future studies of adult morphology, immature stages, ecology and the use of further molecular markers are necessary to determine the exact number of species present in this mosquito complex of public health importance.

**Keywords:** *Anopheles triannulatus*; barcoding; COI; Colombia.

Recibido: 23/09/2022

Aceptado: 21/11/2022

## Introducción

La malaria es una enfermedad tropical potencialmente mortal, que en el año 2018 causó 228 millones de casos y un estimado de 405 000 muertes en el mundo.<sup>(1)</sup> Esta enfermedad es causada por parásitos del género *Plasmodium* spp., los cuales son transmitidos por medio de la picadura de mosquitos (*Anopheles*) hembras infectados.<sup>(1)</sup> El género *Anopheles* tiene 472 especies descritas y ocho subgéneros;<sup>(2)</sup> de los cuales, 41 son consideradas vectores de malaria en el mundo<sup>(2)</sup> y de estas, 11 se encuentran en Colombia.<sup>(3)</sup>

Existen tres vectores principales de malaria en Colombia: *An. albimanus* Wiedemann, *An. darlingi* Root y *An. nuneztovari* Gabaldón y ocho vectores "secundarios": *An. pseudopunctipennis* Theobald, *An. punctimacula* Dyar & Knab, *An. calderoni* Wilkerson, *An. neomaculipalpus* Curry, *An. pholidotus* Zavortink, *An. neivai* Howard, Dyar & Knab, *An. rangeli* Gabaldón, Cova García y López y *An. oswaldoi* Peryassú.<sup>(3,4)</sup> Algunos de estos han sido considerados complejos de especies, como es el caso del *An. oswaldoi*,<sup>(5)</sup> *An. Nuneztovari*,<sup>(6,7)</sup> *An. Pseudopunctipennis*,<sup>(8)</sup> *An. Punctimacula*,<sup>(9)</sup> *An. Calderoni*<sup>(10)</sup> y *An. neivai*.<sup>(11)</sup>

*Anopheles triannulatus* s.l. se describió por primera vez en Rio Cuiabá, Fazenda Sao Joao, Mato Grosso, Brasil (Localidad tipo-LT). Su importancia radica en que es considerado vector secundario de la malaria en Brasil y, posiblemente, en Perú y Venezuela.<sup>(12,13,14)</sup> Es considerado un complejo de especies compuesto por *An. triannulatus* s.s., *An. halophylus* (LT: Salobra, Mato Grosso do Sul, Brasil) y *An. triannulatus* C (LT: Salobra, Mato Grosso do Sul, Brasil);<sup>(15,16)</sup> la única especie incriminada como vector de malaria es la *An. triannulatus* s.s.<sup>(17)</sup>

Si bien en los listados de los vectores de malaria en Colombia, realizados por Montoya-Lerma y otros en 2011<sup>(3)</sup> el *An. triannulatus* no se incluyó, en los trabajos de Rosero y otros<sup>(18)</sup> y Montoya y otros<sup>(19)</sup> esta especie se halló infectada naturalmente con *P. vivax* y *P. falciparum* en Colombia. Esta especie tiene una amplia distribución en el país, al reportarse en 27 departamentos.<sup>(20)</sup>

Basado en las características morfológicas de las hembras y utilizando las claves taxonómicas más frecuentemente empleadas en Suramérica, Faran,<sup>(21)</sup> Faran & Linthicum<sup>(22)</sup> y González y Carrejo,<sup>(20)</sup> solo se puede identificar una especie, *An. triannulatus* s.s., “especies de tamaño pequeño con un parche de escamas claras en el mesanepimero anterior (Mam), y con la parte clara de la vena humeral C pequeña, por lo general 0,5-1,3 veces la longitud de la parte oscura”. Para la identificación de *An. triannulatus* C y *An. halophylus* se debe utilizar los caracteres morfológicos de la genitalia del macho, las larvas y la morfología de los huevos.<sup>(15)</sup> Esta investigación se realizó en el Municipio de Cáceres, Bajo Cauca Antioqueño, región de alta transmisión de malaria, la cual reportó 54 casos en el 2017, 121 casos en el 2018 y 107 casos en el 2019.<sup>(23)</sup> Por su alta endemicidad, la Secretaria Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia (SSSPSA), hacen vigilancia entomológica de vectores de malaria en esta región permanentemente. El objetivo de esta investigación fue dilucidar el estatus taxonómico de *An. triannulatus* s.l. en la vereda los Azules Cáceres, Antioquia, Colombia.

## Métodos

Área de estudio: El muestreo se realizó en la vereda Los Azules, área rural del municipio de Cáceres, Bajo Cauca Antioqueño, latitud 7.58194 y longitud -75.15417, ubicada a cuatro horas del casco urbano de municipio de Cáceres, población dedicada, principalmente, a la ganadería, agricultura y minería.

Muestreo de mosquitos: Los mosquitos se colectaron en corrales de ganado que se encontraban cerca de las viviendas, aproximadamente, entre los 10 a 30 metros, y las 18:00 y 21:00 horas; no fue posible coleccionar mosquitos toda la noche, debido a los problemas de orden público en la zona. Todo el material utilizado para esta investigación forma parte de las colectas realizadas por los técnicos de enfermedades transmitidas por vectores (ETV) de la SSSPSA, durante dos visitas (bimensuales) el primer semestre del 2017 (febrero-mayo). Luego de su captura se enviaron al Instituto Colombiano de Medicina Tropical–Universidad CES, donde todos los especímenes se identificaron con claves morfológicas,<sup>(20,21,22)</sup> previo a la extracción de ADN y posterior confirmación por biología molecular.

Técnicas moleculares: A los especímenes identificados como *An. triannulatus* s.l., se les separó la cabeza y el tórax del abdomen, que se almacenaron para futuros estudios de infectividad. Los abdómenes se destinaron para la extracción del ADN con el DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN®, siguiendo el protocolo de tejido animal y las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación de la región código de barras se siguió el protocolo descrito por Ruiz y otros,<sup>(24)</sup> con los cebadores LCO 1490 y HCO 2198 propuestos por Folmer y otros.<sup>(25)</sup> Los productos se observaron en un gel de agarosa al 1 %.

Las muestras se secuenciaron en ambas direcciones en los laboratorios Macrogen (Corea). Los cromatogramas se editaron en Sequencher V 5.4.6. Se generó un árbol *NeighborJoining*-NJ en Paup v 4, usando un Bootstrap de 1000 réplicas, con la matriz del modelo Kimura 2 parámetros.<sup>(26)</sup> Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en GenBank, usando BLAST y en la base de datos de BOLDsystem. *Anopheles albimanus* y *An. argyritarsis* se utilizaron como grupo externo.

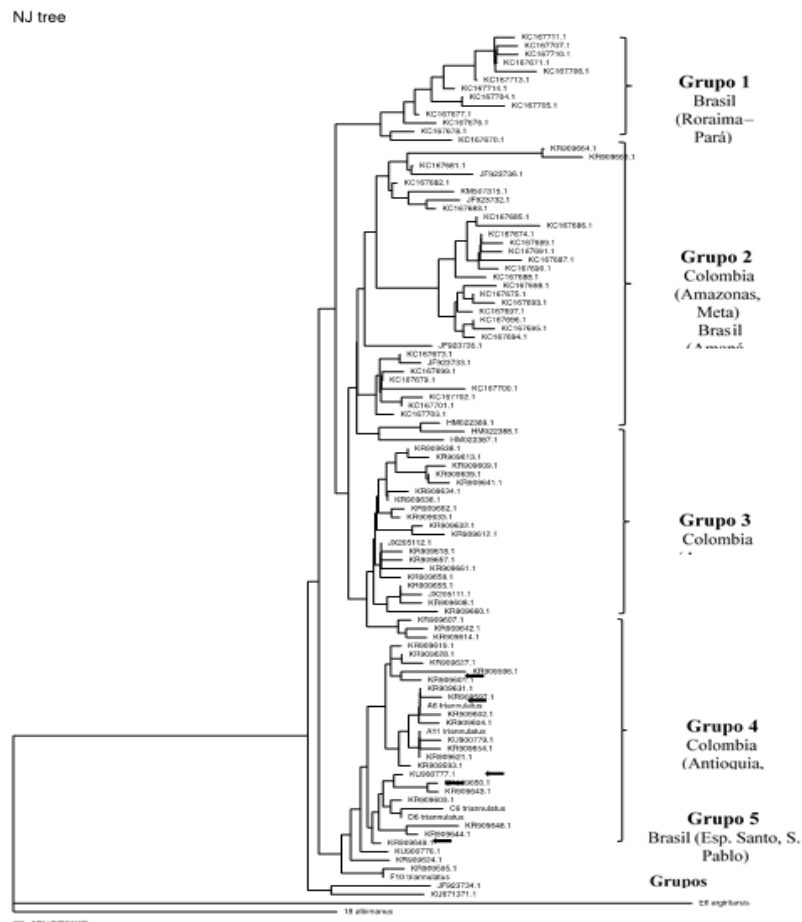
## Resultados

Un total de 233 mosquitos de los 251 colectados fueron *An. triannulatus* s.l.; el resto fue: *An. argyritarsis* (n = 8), *An. neomaculipalpus* (n= 2) y *An. pseudopunctipennis* (n = 8). Dieciséis *An. triannulatus* s.l. se secuenciaron para la región código de barras.<sup>(27)</sup> La región amplificada fue de 710 pb con los cebadores y de 658 pb sin estos. Un total de cinco haplotipos se encontraron en las 16 secuencias obtenidas (A6, A11, C6, D6, F6) (fig. 1), con diferencias entre 1 a 7 pb.

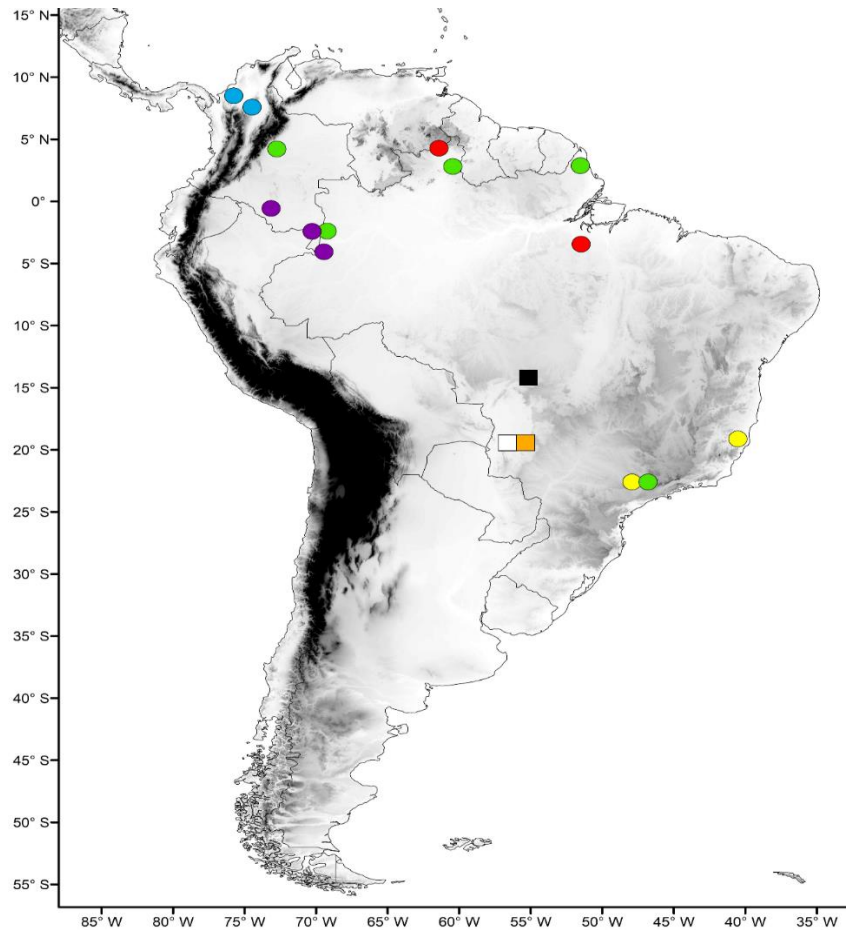
En el GenBank se encontró un total de 538 secuencias entre 449 y 1510 pb. Debido al tamaño tan variable, todas las secuencias que se solaparon con las nuestras (n = 145) se recortaron a un tamaño de 514 pb y las secuencias restantes (n = 393), que amplificaron otro extremo del COI, se descartaron en el análisis. De las secuencias que se solaparon con las nuestras se encontró un total de 101 haplotipos.<sup>(27)</sup>

El análisis de NJ-K2P con nuestras secuencias (5 haplotipos), más las secuencias del GenBank (101 haplotipos), generó un dendrograma con cinco grupos: grupo 1

con 13 secuencias únicamente del norte de Brasil; grupo 2 con 35 secuencias de Colombia y Brasil; grupo 3 con 23 secuencias de Colombia; grupo 4 con 28 secuencias únicamente de Colombia, donde se agruparon los especímenes de esta investigación, Cáceres, Antioquia; y grupo 5 con dos secuencias únicamente de Brasil (figs. 1, 2).



**Fig. 1** – Dendrograma construido con únicos haplotipos *An. triannulatus* s.l. descargados de GenBank y con los encontrados en este estudio (indicados con flechas). Número de acceso en GenBank: MT444891-95. *Anopheles albimanus* y *An. argyritarsis* se utilizaron como grupos externos.



Leyenda: Grupo 1: Rojo; Grupo 2: Verde; Grupo 3: Violeta; Grupo 4: Azul; Grupo 5: Amarillo. Localidades tipo: *An. triannulatus* s.s. rectángulo negro; *An. halophylus* rectángulo blanco; *An. triannulatus* C. rectángulo naranja.

**Fig. 2** – Mapa de Suramérica que muestra la distribución de los diferentes grupos de *An. triannulatus* s.l.

## Discusión

El presente estudio generó nueva información y datos sobre *An. triannulatus* s.l en Colombia, una especie que ha sido muy poco estudiada en el país. La región código de barras<sup>(28,29)</sup> ha sido ampliamente usada, para delimitación de complejos de especies pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus*, con excelentes resultados para dilucidar complejos de especies. Esta región pudo diferenciar *An. dunhami* en Colombia de *An. Nuneztovari*,<sup>(24,30)</sup> las especies presentes en el Complejo Oswaldoi,<sup>(5)</sup> Complejo Albitarsis,<sup>(31)</sup> Complejo Triannulatus,<sup>(32)</sup> entre otros.

En este último, el análisis muestó que el estatus taxonómico de *An. triannulatus* es aún incierto; se observaron varios grupos con alta variación entre ellos; sin

embargo, debido a los valores de *bootstrap* que no soportan todas las topologías presentes (datos no mostrados < 70 %), se consideró que al menos cinco grupos (linajes) estaban claramente diferenciados (fig. 1).

El grupo 1 está conformado por especímenes únicamente del norte de Brasil, Estados de Roraima y Pará. El grupo 2 presenta especímenes tanto del norte de Brasil (Amapá, Roraima, y Pará), como del sur (Sao Pablo); además, algunas secuencias de Colombia (Tarapacá, y Meta). El grupo 3 solo presenta especímenes del Amazonas, Colombia (Amazonas: Leticia, Tarapacá y Puerto Nariño. Putumayo: Puerto Asís). El grupo 4 con secuencias de Colombia (Antioquia, incluyendo nuestras secuencias y Córdoba). Por último, se encuentra el grupo 5, con dos secuencias del Sureste de Brasil (Espíritu Santo y Sao Pablo) (fig. 1, 2).

Desafortunadamente, no se encontraron secuencias en el GenBank, de especímenes colectados en las localidades tipo de *An. triannulatus* s.s., *An. halophylus* y *An. triannulatus* C; las secuencias reportadas en GenBank<sup>(32)</sup> no se solaparon con el fragmento que nosotros amplificamos, esto debido a la utilización de diferentes cebadores.<sup>(31)</sup>

La revisión más detallada de *An. triannulatus* en Suramérica se realizó por Moreno y otros,<sup>(32)</sup> en la cual con sus análisis filogenético de COI (*spanning network*) encontró siete linajes:

- A: Panamá, B: Colombia, Venezuela y Trinidad y Tobago, C: Venezuela y Brasil, D: Nororiente de Brasil, E: Ecuador, Bolivia, Amazonas-Colombia, sur de Brasil, Argentina, F: Noroccidente de Colombia, G: Sureste de Brasil.

Si bien en esta investigación, no se pudieron analizar las secuencias de Moreno y otros,<sup>(32)</sup> debido a que la región de COI amplificadas por estos autores no se solaparon con las nuestras, una posible interpretación de ambas investigaciones, basadas únicamente en distribución geográfica sería: Grupo 1 de esta investigación, podría estar relacionado con el linaje E o el D de Moreno y otros.<sup>(32)</sup> El Grupo 2 estaría relacionado con el linaje B. El Grupo 3 con el linaje E. El Grupo 4 con el linaje F, y el grupo 5 con el Linaje G. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que algunos grupos (linajes), en ambas investigaciones fueron encontradas en



simpatría, como es el caso con el grupo 2 y 3, grupo 2 y 5 en esta investigación (fig. 2), lo que podría cambiar los supuestos anteriormente descritos.

Otra investigación relevante sobre *An. triannulatus* s.l., fue el estudio realizado por Atencia y otros,<sup>(33)</sup> en la cual se evaluó la diversidad genética de *An. triannulatus* en cinco municipios del departamento de Córdoba, concluyendo mediante análisis filogenéticos y red de haplotipos una sola especie. Sin embargo, en el análisis bayesiano de Atencia y otros,<sup>(33)</sup> con especímenes de Putumayo y Meta, se observaron tres grupos o linajes; el primero conformado por especímenes de Putumayo, el segundo por especímenes de Córdoba y Antioquia, un tercer linaje con especímenes únicamente del Meta, Colombia. Agrupaciones similares a las encontradas en nuestra investigación y que se denominaron en esta investigación, Grupo 3, Grupo 4 y Grupo 2, respectivamente. A la vez, los hallazgos son similares a los estudios realizados por Rosero y otros<sup>(18)</sup> y Ahumada y otros.<sup>(27)</sup>

El vector principal de malaria en esta región es *An. Nuneztovari*,<sup>(34)</sup> no obstante, por las altas densidades de *An. triannulatus* encontradas en este estudio, 233 de 251 *anophelinos* colectados, y por los hallazgos previos de *An. triannulatus* s.l. infectados naturalmente con *P. falciparum* y *P. vivax* en Colombia,<sup>(18,19)</sup> resulta necesario realizar futuros estudios de infectividad natural en Cáceres, Antioquia; para averiguar si *An. triannulatus* s.l. podría estar involucrado en la transmisión de malaria en la región.

En esta investigación se observó la complejidad de *An. triannulatus* s.l. en Suramérica, con tres grupos o linajes claramente establecidos en Colombia, uno en el noroccidente de Colombia, otro en el sur y un último grupo en centro oriente de Colombia, que se comparte con Brasil y posiblemente con Venezuela. Los especímenes *An. triannulatus* s.l. recolectados en esta investigación hacen parte del grupo o linaje noroccidental de Colombia. Futuros estudios de morfología de este complejo, revisando todos sus estadios de desarrollo, serán necesarios para esclarecer el número de especies presentes en el complejo *An. triannulatus* en Colombia y Suramérica.

## Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva; 2019 [acceso 03/08/2020]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330011/9789241565721-eng.pdf>
2. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012;5:69. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>
3. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, *et al.* Malaria vector species in Colombia: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(S1):223-38. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011>
4. Harrison BA, Ruiz-Lopez F, Falero GC, Savage HM, Pecor JE, Wilkerson RC. *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*. 2012;3218:1-17.
5. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Sallum MAM, Velez ID, *et al.* Systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) in South America. *Parasit Vectors*. 2013;6:324. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-324>
6. Hribar J. Geographic Variation of Male Genitalia of *Anopheles nuneztovari* (Diptera:Culicidae). *Mosq Syst*. 1994;26(3):132-44.
7. Fritz GN, Conn J, Cockburn A, Seawright J. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol*. 1994;11(3):406-16.
8. Coetzee M, Estrada-Franco JG, Wunderlich CA, Hunt RH. Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(4):649-53. DOI: <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60>
9. Urrea-Aguirre PA, Correa-Ochoa MM, Naranjo-Díaz NJ. Variabilidad genética de *Anopheles punctimacula* s.l. en dos localidades de la zona endémica para la malaria: El Bajo Cauca y Alto Sinú. *Hechos microbiológicos*. 2014;5(2):51-62.

10. Rodríguez-Zabala J, González R, Correa MM, Gómez GF. Análisis morfométrico de dos poblaciones de *Anopheles* (*Anopheles*) *calderoni* (Diptera: Culicidae) del suroccidente colombiano. *Rev Mex Biodivers.* 2016;87(3):966-71. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06>
11. López-Rubio A, Suaza-Vasco J, Marcet PL, Ruíz-Molina N, Cáceres L, Porter C, *et al.* Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia. *Zootaxa.* 2016;4175(4):377-89. DOI: <https://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4175>
12. Silva Do Nascimento TF, Lourenco-de-Oliveira R. *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(6):801-11. DOI: <https://dx.doi.org/S0074-0276200200060001>
13. Aramburú-Guarda J, Ramal-Asayag C, Witzig R. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon Region. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(2):209-15. DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid0502.990204>
14. Benarroch E. Studies of malaria in Venezuela. *Am J Hyg.* 1931;14:690-3.
15. Silva-do-Nascimento TF, Lourenço-de-Oliveira R. Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the *Triannulatus* Complex (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(8):975-82. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007>
16. Rosa-Freitas MG, Tsouris P, Peterson AT, Honório NA, De Barros FSM, De Aguiar DB, *et al.* An ecoregional classification for the state of Roraima, Brazil. The importance of landscape in malaria biology. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(3):349-57. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007>
17. Galardo AKR, Arruda M, D'Almeida Couto AAR, Wirtz R, Lounibos LP, Zimmerman RH. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):461-69. DOI: <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76>
18. Rosero DA, Jaramillo LM, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM. Genetic diversity of *Anopheles triannulatus* s.l. (Diptera: Culicidae) from Northwestern and Southeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(5):910-20. DOI: <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0>.

19. Montoya C, Bascuñán P, Rodríguez-Zabala J, Correa MM. Abundance, composition and natural infection of Anopheles mosquitoes from two malaria-endemic regions of Colombia. *Biomédica*. 2017;37(S2):98-105. DOI: <https://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2>
20. González R, Carrejo NS. Introducción al estudio taxonómico de Anopheles de Colombia. Claves y notas de distribución. 2nd ed. Cali, Colombia: Editorial Universidad del Valle; 2009.
21. Faran ME. Mosquitoes studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus Nyssorhynchus of Anopheles. 1980;15(7):213.
22. Faran M, Linthicum K. A handbook of the Amazonian species of Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst*. 1981;13(1):1-81.
23. Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia. Eventos de interés en salud pública por subregiones y municipios. Antioquia 2007 – 2018. Medellín; 2019 [acceso 09/08/2020]. Disponible en: <http://dssa.gov.co/index.php/estadisticas/eventos-en-salud-publica/item/71-eventos-de-interes-en-salud-publica-por-subregiones-y-municipios-antioquia-2007-2016>
24. Ruiz F, Linton YM, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Quiñones ML, *et al*. Molecular comparison of topotypic specimens confirms Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):899-903. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010>
25. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3(5):294-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.1071/Z09660275>
26. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16(1330):111-20.
27. Ahumada ML, Orjuela LI, Pareja PX, Conde M, Cabarcas DM, Cubillos EFG, *et al*. Spatial distributions of Anopheles species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of

- Colombia. Malar J. 2016;15:407. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/s12936-016-1421-4>
28. González MA. Códigos de barras de ADN - tras las huellas de las especies. Hipótesis Apunt Científicos Uniandinos. 2012;12:51-6.
29. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc B Biol Sci. 2003;270(1512):313-21. DOI: <https://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
30. Ruiz F, Quiñones ML, Erazo HF, Calle DA, Alzate JF, Linton YM. Molecular differentiation of Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi and An. (N.) oswaldoi from Southern Colombia. Memorias Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(2):155-60.
31. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, *et al*. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (Anopheles: Nyssorhynchus) of Neotropical malaria vectors. Parasites and Vectors. 2012;5:44. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-44>
32. Moreno M, Bickersmith S, Harlow W, Hildebrandt J, McKeon SN, Silva-do-Nascimento TF, *et al*. Phylogeography of the neotropical Anopheles triannulatus complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. Parasit Vectors. 2013;6:47. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-47>.
33. Atencia M, Toro-Cantillo A, Hoyos-López R. Diversidad genética y estructura poblacional de Anopheles triannulatus s.l. en Córdoba, Colombia, determinadas mediante el método de región de código de barras de ADN. Biomédica. 2018;38:117-26. DOI: <https://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v38i0>
34. Instituto Nacional de Salud. Informe vigilancia entomológica de malaria, Colombia 2018. Bogota D.C.; 2019 [acceso 03/08/2020]. Disponible en: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin\\_de\\_laboratorio/Informe-vigilancia-entomologica-Malaria-Colombia-2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin_de_laboratorio/Informe-vigilancia-entomologica-Malaria-Colombia-2018.pdf)

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

### Contribución de los autores

*Conceptualización:* Freddy Ruiz-López, Wilber Gómez-Vargas.

*Curaduría de datos:* Freddy Ruiz-López.

*Análisis formal:* Paulina Gutiérrez-Arbelaéz, Wilber Gómez-Vargas, Freddy Ruiz-López.

*Adquisición de fondos:* Paulina Gutiérrez-Arbelaéz, Wilber Gómez-Vargas, Juan Fernando Ríos-Cadavid.

*Investigación:* Paulina Gutiérrez-Arbelaéz, Wilber Gómez-Vargas, Freddy Ruiz-López.

*Metodología:* Paulina Gutiérrez-Arbelaéz, Wilber Gómez-Vargas, Freddy Ruiz-López.

*Administración del proyecto:* Wilber Gómez-Vargas.

*Recursos:* Paulina Gutiérrez-Arbelaéz, Wilber Gómez-Vargas.

*Software:* Freddy Ruiz-López.

*Supervisión:* Freddy Ruiz-López.

*Validación:* Freddy Ruiz-López, Juan Fernando Ríos-Cadavid.

*Redacción – borrador original:* Paulina Gutiérrez-Arbelaéz.

Redacción – revisión y edición: Wilber Gómez-Vargas, Juan Fernando Ríos-Cadavid, Freddy Ruiz-López.