

AÑO 2018

VIGILANCIA ENTOMOLÓGICA DE FLAVIVIRUS EN EL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA, COLOMBIA.

Autor: Ader Aleman Romero

RESUMEN.

Flavivirus es un género de virus que pertenecen a la familia *Flaviviridae*, son un grupo de más de 70 virus envueltos tipo ARN, de cadena sencilla, algunos pueden causar encefalitis o fiebres hemorrágicas en humanos y animales. Según los análisis filogenéticos los flavivirus se pueden clasificar en tres grupos: flavivirus transmitidos por artrópodos (que pueden dividirse en transmitidos por mosquitos y los transmitidos por garrapatas) y los que no se les conocen vectores artrópodos (vertebrados específicos), y los flavivirus insectos específicos (propios de mosquitos). En Colombia se ha reportado la circulación de al menos cinco flavivirus patógenos transmitidos por mosquitos vectores virus Dengue (DENV), y Virus de la fiebre amarilla (VFA), virus del oeste del Nilo (VON) y virus de la encefalitis de San Louis (SLV). **Objetivo.** Realizar una vigilancia entomológica de flavivirus circulantes en mosquitos del departamento de Córdoba. **Materiales y métodos.** Estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal en el cual se realizó una vigilancia de flavivirus en mosquitos de tres municipios del departamento de Córdoba: Montería, Purísima y Tierralta. Entre agosto y diciembre de 2012. Se capturaron mosquitos por medio de trampas de luz tipo CDC, trampas BG-Sentinel y métodos de captura manual (aspiradores bucales), fueron agrupados por especie, fecha y lugar de captura, a cada grupo o muestra se analizó por la técnica de RT-PCR, convencional para amplificar un fragmento de 958pb, del gen NS5 de Flavivirus. Posteriormente para la identificación del virus detectado en las muestras positivas se les realizó secuenciación a los productos de las mismas. **Resultados.** Entre agosto y diciembre de 2012, se capturaron al menos 9.898 mosquitos, de los cuales solo se identificaron y procesaron 8270, ordenados en 334 *pools* (2 a 50 mosquitos por *pool*). No se obtuvieron grupos de mosquitos positivos para Flavivirus patógenos en el departamento de Córdoba. Durante la búsqueda de Flavivirus se detectaron dos muestras positivas para *Culex flavivirus* (virus mosquito específico), en mosquitos de la especie *Culex coronator*. **Conclusiones.** Durante la vigilancia entre agosto y diciembre de 2012 solo se detectaron las cepas del virus *Culex flavivirus* denominadas como “CxFv COL PM_149” (acceso en GenBank: KR014201) Y la cepa “CxFv COL PM_212” (acceso en GenBank: KT307717). Estos hallazgos generan luces para tratar de explicar por qué no se han presentado casos de enfermedad en el Caribe colombiano, causados por el virus del oeste del Nilo y virus de la encefalitis de San Louis, a pesar de existir los vectores correspondientes.

Palabras clave: Flavivirus, genoma, análisis filogenético, vector, *Culex flavivirus*.

ABSTRACT.

Flavivirus is a genus of viruses belonging to the *Flaviviridae* family, are a group of more than 70 enveloped viruses type RNA, single-stranded, some may cause encephalitis and / or hemorrhagic fevers in humans and animals. According to phylogenetic analysis, flavivirus can be classified into three groups: flavivirus arthropod-borne (which can be divided into

transmitted by mosquitoes and transmitted by ticks), and those who are not known arthropod vectors (specific vertebrate), and flavivirus specific on insects. In Colombia has been reported circulation of at least five pathogenic flavivirus, transmitted by mosquitoes Dengue Virus (DENV), virus of yellow fever (VFA), Virus West Nile (WNV) and Encephalitis Virus, St. Louis (SLV). **Objective.** Perform an entomological surveillance of circulating flaviviruses in mosquitoes of the department of Córdoba. **Materials and methods.** A descriptive, prospective cross-sectional study flavivirus surveillance in mosquitoes was conducted in three municipalities in the department of Córdoba: Montería, Tierralta and Purísima. Between August and December 2012, mosquitoes were caught by traps CDC light, traps BG-Sentinel and manual capture methods (oral suction), these were grouped by species, date and place of capture, each group or sample it was analyzed by conventional technique RT-PCR to amplify a fragment of 958 pb of the NS5 gene for Flavivirus. Subsequently, the positive products were sequenced to identify the species of virus detected in positive samples. **Results.** Between August and December 2012, at least 9,898 mosquitoes were captured, of which 8270 were identified and processed, and were ordered in 334 pools (2-50 mosquitoes per pool). No group's mosquitoes were found positive for flavivirus pathogens in the department of Córdoba. During the search for flavivirus, two samples were found positive for *Culex flavivirus* (mosquitoes specific virus) in *Culex coronator* mosquitoes. **Conclusions.** In this study strains of *Culex flavivirus* referred to as "CxFv COL PM_149" (GenBank accession: KR014201) and "CxFv COL PM_212" (GenBank accession: KT307717) were detected. These findings could be the key to try to explain why there have been no cases of disease caused by West Nile Virus and Encephalitis Virus, St. Louis in the Colombian Caribbean, despite the existence of the corresponding vectors.

KEY WORDS: Flavivirus, genome, phylogenetic analysis, vector, *Culex flavivirus*.

AÑO 2018
**ESTUDIO DEL VIRUS CHIKUNGUNYA: ANALISIS FILOGENOMICO,
VARIABILIDAD GENETICA Y POSIBLES RUTAS GEOGRAFICAS DE
INTRODUCCION A COLOMBIA**

Autor: Yeneiris Villeros Wolf

RESUMEN

El virus de Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus que se transmite por mosquitos *Aedes aegypti* y causa una enfermedad febril acompañada de dolor articular severo. El CHIKV es considerado un problema de salud pública debido a su rápida propagación y alta morbilidad. Las mutaciones en el genoma del CHIKV han permitido que se adapte a diferentes entornos ecológicos y nuevos vectores. **Objetivo.** Analizar el virus *Chikungunya* desde la perspectiva filogenética, evolutiva y posibles rutas de introducción geográfica en Colombia. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio descriptivo de tipo retrospectivo a partir de 57 sueros humanos y 4 macerados de mosquitos positivos por qRT-PCR para CHIKV. Las muestras fueron recolectados en el año 2014 durante el brote de fiebre Chikungunya en Colombia y provenían de la región Caribe (Bolívar, Sucre, Córdoba) y región andina (Risaralda, Huila y Cauca). Para el aislamiento viral, 40 ul de muestra fueron agregados a monocapas confluentes de células C6/36 y Vero. 16 aislados virales fueron seleccionados para amplificación y secuenciación del genoma. El ARN viral se extrajo de los sobrenadantes del cultivo usando QIAamp® Viral RNA Mini kit (QIAGEN®, Alemania). La síntesis de cDNA se realizó mediante primer random hexamers y M-MLV™ Reverse Transcriptase (Promega®). La amplificación se realizó mediante 12 juegos de iniciadores previamente reportados por Splaeford *et al*, que amplificaban desde el nucleótido 17 hasta el 11.993. Los amplicones se secuenciaron con Hi-seq2500® (illumina®). Los genomas se ensamblaron empleando el software Iterative Virus Assembler y los análisis filogenéticos se realizaron con BEAST™ versión 1.8.4. **Resultados.** Se lograron aislamientos virales en 54 de 57 (96,5%) de las muestras. El 65,4% (n=36/55) de los virus aislados provenían de Cartagena, 29% (n=16/55) de Ovejas, 1,8 % de Planeta Rica y 1, 8% de Mahates. No se logró aislar el virus a partir de mosquitos. Filogenéticamente el CHIKV se dividió en 3 genotipos: Africano occidental (WA), Este,

Central y Sur África (ECSA), y asiático (AS). El Africano occidental fue el genotipo más ancestral con un patrón de evolución y distribución geográfica limitada a África. El genotipo ECSA se dividió en tres clados: el primero agrupó cepas enzooticas que no se han detectado desde 1976; el segundo clado también agrupó cepas enzooticas que han circulado desde el año 1962 y fue detectado en Brasil en el año 2014 y el tercer clado agrupó las cepas que ocasionaron la epidemia del Océano Índico y la India. Respecto al genotipo asiático, se determinó que la ruta de expansión global inició con una cepa ancestral en Tailandia en 1958, que posteriormente llegó a Indonesia en el 2007, Filipinas entre 2011-2013 y finalmente en 2013-2014 alcanzó las Islas del Caribe y las Américas. El clado correspondiente a la epidemia en la Américas y el Caribe estuvo estrechamente relacionado con la cepa de Filipinas 2013 AB860301. Las secuencias Colombianas (16 de este estudio y 5 previamente publicadas en el Gen-Bank) se agruparon en el genotipo asiático pero en 3 subclados con cepas de orígenes geográficos distintos: i. la cepa panameña (KR559486) se relacionó con las del Caribe colombiano y Huila; ii. la cepa de Nicaragua (KY703969) fue cercana a Risaralda y Cauca iii. La cepa de St. Barts (KR559497) se relacionó con un CHIKV que circula posiblemente en Cundinamarca. Las cepas tuvieron mutaciones específicas que las diferenciaron de otras cepas asiáticas. Las mutaciones T-2139-C (nsP2-A153V) y C-2305-T fueron únicas para las cepas de Panamá, el Caribe colombiano y Huila. Las mutaciones T-3308-C (AA. nsP2-Y543H), G3840C (AA. nsP2-G720A) y T-5445-C (AA. nsP3-L458P) solo estuvieron presentes en las cepas de Nicaragua, Risaralda y Cauca. Las mutaciones A-5356-G, C-6676-T y G-7787-A (AA. C-R78Q) fueron únicas para St Barts y Cundinamarca. Se detectaron 40 sitios variables entre la cepa panameña (KR559486) y las provenientes del Caribe Colombiano Huila. Al comparar las cepas de Risaralda y Cauca con las de Nicaragua, se detectaron 18 polimorfismos; y en la de Saint Bart con Cundinamarca dos. **Conclusiones:** el CHIKV asiático que circula en las Américas se introdujo directamente desde Filipinas. El CHIKV Colombiano provino de tres sitios geográficos diferentes: Panamá, Nicaragua y St. Barts. Las cepas que circulan en Colombia, Panamá, Nicaragua y Saint Barts tienen mutaciones sinónimas y no sinónimas que las diferencian de otras a nivel mundial. El CHIKV adquirió polimorfismos durante el brote en Colombia, posiblemente asociados con adaptación a

vectores o un aumento de la patogenicidad viral. Los hallazgos son importantes para entender la dinámica de transmisión y biología del CHIKV en Colombia y las Américas.

Palabras clave: arbovirus, alfavirus, epidemiología molecular, salud pública.

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an alpha virus that is transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes and causes a febrile illness accompanied by severe joint pain. CHIKV is considered a public health problem due to its rapid spread and high morbidity. Mutations in the CHIKV genome have allowed it to adapt to different ecological environments and new vectors. **Objective.** Analyze the Chikungunya virus from the phylogenetic, evolutionary perspective and possible geographical introduction routes in Colombia. **Materials and methods.** A retrospective descriptive study was conducted from 57 human sera and 4 macerated positive mosquitoes by qRT-PCR for CHIKV. The samples were collected in 2014 during the outbreak of Chikungunya fever in Colombia, samples were from the Caribbean region (Bolívar, Sucre, Córdoba) and the Andean region (Risaralda, Huila and Cauca). For viral isolation, 40 ul of sample were added to confluent monolayers of C6 / 36 and Vero cells. 16 viral isolates were selected for amplification and genome sequencing. Viral RNA was extracted from the culture supernatants using QIAamp® Viral RNA Mini kit (QIAGEN®, Germany). The synthesis of cDNA was performed by first random hexamers and M-MLV™ Reverse Transcriptase (Promega®). Amplification was carried out using 12 sets of primers previously reported by Splaeford et al, which amplified from nucleotide 17 to 11,993. The amplicons were sequenced with Hi-seq2500® (illumina®). The genomes were assembled using the Iterative Virus Assembler software and the phylogenetic analyzes were performed with BEAST™ version 1.8.4. **Results.** Viral isolations were achieved in 54 of 57 (96.5%) of the samples. 65.4% (n = 36/55) of the isolated viruses came from Cartagena, 29% (n = 16/55) from Ovejas, 1.8% from Planeta Rica and 1.8% from Mahates. It was not possible to isolate the virus from mosquitoes. Phylogenetically the CHIKV was divided into 3 genotypes: Western African (WA), Eastern, Central and South Africa (ECSA), and Asian (AS). Western Africa was the most ancestral genotype with a pattern of evolution and geographical distribution limited to Africa. The ECSA genotype was divided into three clades: the first group of enzootic

strains that have not been detected since 1976; the second clade also grouped enzootic strains that have circulated since 1962 and was detected in Brazil in 2014 and the third clade grouped the strains that caused the epidemic of the Indian Ocean and India. Regarding the Asian genotype, it was determined that the global expansion route began with an ancestral strain in Thailand in 1958, which subsequently arrived in Indonesia in 2007, the Philippines between 2011-2013 and finally in 2013-2014 reached the Caribbean Islands and the Americas. The clade corresponding to the epidemic in the Americas and the Caribbean was closely related to the Philippine strain 2013 AB860301. The Colombian sequences (16 of this study and 5 previously published in the Gen-Bank) were grouped in the Asian genotype but in 3 subclades with strains of different geographical origins: i. the Panamanian strain (KR559486) was related to those of the Colombian Caribbean and Huila; ii. the strain of Nicaragua (KY703969) was close to Risaralda and Cauca iii. The strain of St. Barts (KR559497) was related to a CHIKV possibly circulating in Cundinamarca. The strains had specific mutations that differentiated them from other Asian strains. The mutations T-2139-C (nsP2-A153V) and C-2305-T were unique for the strains of Panama, the Colombian Caribbean and Huila. The mutations T-3308-C (AA, nsP2-Y543H), G3840C (AA, nsP2-G720A) and T-5445-C (AA, nsP3-L458P) were only present in the strains of Nicaragua, Risaralda and Cauca. The mutations A-5356-G, C-6676-T and G-7787-A (AA.C-R78Q) were unique for St Barts and Cundinamarca. We detected 40 variable sites between the Panamanian strain (KR559486) and those from the Colombian Caribbean Huila. When comparing the Risaralda and Cauca strains with those from Nicaragua, 18 polymorphisms were detected; and in the one of Saint Bart with Cundinamarca two. **Conclusions:** Asian CHIKV circulating in the Americas was introduced directly from the Philippines. The Colombian CHIKV came from three different geographic locations: Panama, Nicaragua and St. Barts. The strains that circulate in Colombia, Panama, Nicaragua and Saint Barts have synonymous and non-synonymous mutations that differentiate them from others worldwide. CHIKV acquired polymorphisms during the outbreak in Colombia, possibly associated with adaptation to vectors or an increase in viral pathogenicity. The findings are important to understand the dynamics of transmission and biology of CHIKV in Colombia and the Americas.

Key words: arbovirus, alphavirus, molecular epidemiology, public health.

AÑO 2018

EMERGENCIA DEL VIRUS DEL LAGO DE LA TILAPIA (TiLV), EN GRANJAS PISCICOLAS DEL DEPARTAMENTO DE CORDOBA, COLOMBIA 2016-2017

Autor: Hector Contreras Martinez

RESUMEN

Introducción. Tilapia virus (TiLV) es un virus emergente que ha sido asociado a altas mortalidades en cultivos de tilapia en Israel, Tailandia, Ecuador, Egipto, India, Malasia y Colombia generando grandes pérdidas económicas a los productores acuícolas. **Objetivo.** Describir algunos aspectos epidemiológicos y moleculares de la infección por TiLV en granjas piscícolas del Departamento de Córdoba, Colombia. **Métodos.** Debido a los episodios de mortalidad en fincas del Departamento de Córdoba, entre julio de 2016 y diciembre de 2017 se llevó a cabo un estudio descriptivo prospectivo en diez granjas piscícolas, mediante muestreo no aleatorio de 89 peces vivos con y sin signos clínicos de enfermedad. El examen clínico macroscópico de los órganos externos e internos se realizó in situ. De cada animal se extrajo de manera aséptica el hígado, bazo y encéfalo, los cuales fueron colocados en RNA Later®, para su transporte al instituto de investigaciones biológicas de la Universidad de Córdoba, Colombiano. A cada órgano se le realizó extracción de ARN con Trizol® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó retrotranscripción con primers random y retrotranscriptasa M-MLV (Promega), el cDNA obtenido se almacenó a -40°C hasta su uso. Posteriormente se realizó una PCR usando primers específicos propuestos por Eyngor et al. (2014), que amplificaron una región del segmento 3 de 491 pb. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% w/v y Sybr safe al 4% v/v. Los amplicones se secuenciaron mediante el método de Sanger, se analizaron usando el programa MEGA 6.0 y se alinearon con secuencias anotadas en Genbank. Se realizó una prueba de Irwin-Fisher, regresión logística para determinar significancia de signos clínicos usando el programa Infostat para determinar dependencia de los datos. **Resultados.** Se detectó TiLV en el 42,85% (3/7) de las granjas muestreadas y en el 20,2% (18/ 89) del total de los peces analizados. De otro lado, en el 33,33% (1/3) de las granjas el virus se presentó tanto en animales con signos clínicos como en aquellos aparentemente sanos. Considerando solo aquellas granjas positivas para TiLV, las infecciones de tejido encefálico representaron el 64,3% (18/28), de los cuales 22,2% (4/18), eran animales aparentemente sanos y 77,7% (14/18) de animales con algún signo clínico evidente. Las infecciones en el bazo se presentaron en un 61,9% (13/21), de las cuales 15,38% (2/13) fueron animales aparentemente sanos y 84,6% (11) eran de animales con algún signo clínico. La infección hepática fue de un 35,7% (10/28), estas solo se detectaron en animales con algún signo clínico. El análisis estadístico demostró que signos clínicos como encefalomegalia y esplenomegalia fueron altamente significativos ($p < 0,0001$) en animales positivos para TiLV. El análisis de secuencias demostró identidad del 97% con cepas de Israel. **Conclusiones.** Este es el primer estudio en el Departamento de Córdoba que confirma la detección molecular de TiLV, es el primero en Colombia que

reporta al GenBank secuencias nucleotídicas de las cepas circulantes de TiLV. Los análisis de homología nucleotídica, arrojaron que las cepas circulantes detectadas en el presente estudio presentan un 97% de identidad con la cepa israelí (GenBank KU751816.1), lo que sugiere que llegó a Colombia por la importación de alevinos infectados. Este trabajo es el primero que registra proporciones de mortalidad en peces, las lesiones encefálicas fueron las más comunes y prevalentes en peces infectados, las lesiones hepáticas esplenomegalia, aletas erosionadas también fueron altamente significativas ($p<0,05$). El hallazgo de TiLV representa un riesgo económico para el sector acuícola por las altas mortalidades.

Palabras clave: Fish disease, animal viruses, *Oreochromis niloticus*, orthomyxovirus infection surveillance, epidemiology, and end results program,

ABSTRACT

Introduction. Tilapia virus (TiLV) is an emerging virus that has been associated with high mortalities in tilapia cultures in Israel, Thailand, Ecuador, Egypt, India, Malaysia and Colombia generating great economic losses to aquaculture producers. **Objective.** To describe some epidemiological and molecular aspects of the infection by TiLV in fish farms of the department of Córdoba, Colombia. **Methods.** Due to the episodes of mortality in farms of the department of Córdoba, between July 2016 and December 2017 a prospective descriptive study was carried out in ten fish farms, by non-random sampling of 89 live fish with and without clinical signs of disease. The macroscopic clinical examination of the external and internal organs was performed in situ. The liver, spleen and brain were extracted aseptically from each animal, which were placed in RNA Later®, for transport to the biological research institute of the University of Córdoba, Colombia. Each organ was extracted RNA with Trizol® following the manufacturer's instructions. A retrotranscription was performed with random primers and retrotranscriptase M-MLV (Promega, USA), the obtained cDNA was stored at -40°C until its use. Subsequently, a PCR was performed using specific primers proposed by Eyngor y col in 2014, which amplified a segment 3 region of 491 bp. The PCR products were visualized by electrophoresis in 1.5% w / v agarose gel and 4% v / v Sybr safe. The amplicons were sequenced using the Sanger method, analyzed using the MEGA 6.0 program and confronted with previous sequence annotations deposited in Genbank. An Irwin-Fisher test was performed, logistic regression to determine the significance of clinical signs using the Infostat program to determine the dependence of the data. **Results.** TiLV was detected in 42,85% (3/7) of the sampled farms and in 20.2% (18/89) of the total fish analyzed. On the other hand, in 33.33% (1/3) of the farms the virus appeared both in animals with clinical signs and in those apparently healthy. Considering only those farms positive for TiLV, brain tissue infections accounted for 64.3% (18/28), of which 22.2% (4/18) were apparently healthy animals and 77.7% (14 / 18) of animals with some obvious clinical signs. Infection in the spleen occurred in 61.9% (13/21), of which 15.38% (2/13) were apparently healthy animals and 84.6% (11) were of animals with some clinical sign . The liver infection was 35.7% (10/28), these were only detected in animals with some clinical sign. The statistical analysis showed that clinical signs such as encephalomegaly and splenomegaly were highly significant ($p<0.0001$) in animals positive for TiLV. Sequence analysis showed 97% identity with strains from Israel. **Conclusions.** This is the first study in the department of

Córdoba that confirms the molecular detection of TiLV, it is the first in Colombia that reports to GenBank nucleotide sequences of the circulating strains of TiLV. The analysis of nucleotide homology, showed that the circulating strains detected in the present study have a 97% identity with the israeli strain (GenBank KU751816.1), which suggests that it arrived in Colombia by the importation of infected fingerlings. This work is the first that reports proportions of mortality in fish, brain injuries were the most common and prevalent in infected fish, liver lesions splenomegaly, eroded fins were also highly significant ($p<0.05$). The finding of TiLV represents an economic risk for the aquaculture sector due to the high mortalities.

Words key: Fish disease, animal viruses, *Oreochromis niloticus*, orthomyxovirus infection surveillance, epidemiology, and end results program.

AÑO 2018

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Anopheles*
SUBGÉNERO *Nyssorhynchus*, UTILIZANDO EL GEN CITOCROMO C
OXCIDASA SUBUNIDAD I COI-BARCODE EN ZONAS ENDEMICAS PARA
MALARIA EN EL DEPARTAMENTO DE CORDOBA.**

Autor: Maria Caludia Atencia Pineda

RESUMEN

Los mosquitos del género *Anopheles* son considerados vectores de malaria en todo el mundo, de las nueve especies incriminadas como vectores primarios, seis pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus*; y al menos doce especies son consideradas vectores secundarios. Taxonómicamente, las especies del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) son extremadamente difíciles de diferenciar con base en caracteres anatómicos, generando posibles consecuencias en la efectividad de los programas de control vectorial. Frente a esta situación se hace necesario realizar una adecuada identificación taxonómica de las especies del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) como criterio fundamental para la incriminación vectorial, la medición del riesgo epidemiológico y el desarrollo de programas de control.

Objetivo. Caracterizar la secuencia nucleotídica del gen *COI* en mosquitos del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), presentes en ocho veredas y/o corregimientos del departamento de Córdoba.

Materiales y Métodos. Se secuenciaron 267 productos de PCR del gen *COI* de procedentes de xxx especies del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). Las secuencias obtenidas y el alineamiento consenso se usaron para estimar matrices de distancia genética intraespecífica e interespecífica, utilizando el software MEGA 7. También se estimaron los parámetros de diversidad genética DH , π y las pruebas de neutralidad utilizando el programa DnaSP v5; las redes de haplotipos por especies fueron inferidas con el programa NETWORK v5. Los estimadores de diferenciación genética FST y flujo génico Nm se calcularon con el programa ARLEQUIN v3.5 y el árbol de relaciones filogenéticas se construyó mediante inferencia bayesiana con el modelo de sustitución nucleotídica HKY + G en el programa MrBayesv3.

Resultados. Las especies identificadas por medio de la secuencia del gen *COI* fueron *An. nuneztovari*, *An. albimanus*, *An. triannulatus*, *An. oswaldoi* B, *An. darlingi*, *An. janconnae*, *An. malefactor* y *An. pseudopuctipennis*. Las distancias genéticas intraespecífica e interespecífica oscilaron entre 0 - 0.9% y 6.1-15.8% respectivamente. Se hallaron 9 haplotipos para *An. nuneztovari*, 14 para *An. albimanus*, 44 para *An. triannulatus* y 5 para *An. oswaldoi* B; las especies con los valores más alto de diversidad genética fueron *An. albimanus* ($DH= 0.918$; $\pi= 0.003$), *An. triannulatus* ($DH= 0.902$; $\pi= 0.005$) y *An. oswaldoi* B ($DH= 0.900$; $\pi= 0.009$). Las pruebas de neutralidad Tajima'D y Fu's F_s arrojaron valores negativos, sugiriendo que las poblaciones de *An. nuneztovari*, *An. albimanus* y *An. triannulatus* pasaron por un proceso

de expansión poblacional. Los valores obtenidos en los estimadores de diferenciación genética F_{ST} y flujo génico Nm , en general para las especies *An. nuneztovari*, *An. albimanus* y *An. triannulatus* indican que las poblaciones de estas especies son genéticamente semejantes. El análisis bayesiano muestra cada especie como un clado monofilético y reveló dos linajes genéticos para *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles oswaldoi* B, *Anopheles triannulatus*. **Conclusión.** El gen mitocondrial *COI* es una herramienta útil para la identificación taxonómica molecular certera de las especies de subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*); pero además permite realizar estudios de diversidad genética, estructura poblacional y análisis filogenético, aspectos importantes para la epidemiología y el control de la malaria.

PALABRAS CLAVES:, subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), *COI*, Barcode, identificación taxonómica y diversidad genética.

ABSTRACT

The mosquitoes of the genus *Anopheles* are considered vectors of malaria in the whole world, of the nine species incriminated as primary vectors, six belong to the subgenus *Nyssorhynchus*; However, in this subgenus at least twelve species are considered secondary vectors. But the species of the subgenus *Nyssorhynchus* are extremely difficult to differentiate morphologically, generating possible consequences in the effectiveness of vector control programs. Therefore, it is necessary to make an adequate taxonomic identification of the *Anopheles* species as a fundamental criterion for vectorial incrimination, the epidemiological risk measurement and the development of control programs. **Objective.** Molecular characterization of the *COI* gene in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) useful for the molecular taxonomic identification of the species, found in eight villages and/or rural areas of the department of Córdoba. **Materials and methods.** 267 PCR products of the *COI* gene of *Anopheles* species were sequenced. Sequences obtained and alignment consensus, were used to estimate intraspecific and interspecific genetic distance matrices, using MEGA 7 software. The genetic diversity parameters DH , π and the neutrality tests were also estimated using the DnaSP v5 program; the haplotype networks by species were inferred with the NETWORK v5 program. The estimators of genetic differentiation F_{ST} and gene flow Nm were calculated with the program ARLEQUIN v3.5 and the tree of phylogenetic relationships was constructed by Bayesian inference with the model of nucleotide substitution HKY + G in the program MrBayesv3. **Results.** The species identified by sequence of the *COI* gene were *An. nuneztovari*, *An. albimanus*, *An. triannulatus*, *An. oswaldoi* B, *An. darlingi*, *An. janconnae*, *An. malefactor* and *An. pseudopuctipennis*. Intraspecific and interspecific genetic distances ranged between 0 - 0.9% and 6.1-15.8% respectively. We found 9 haplotypes for *An. nuneztovari*, 14 for *An. albimanus*, 44 for *An. triannulatus* and 5 for *An. oswaldoi* B; the species with the highest genetic diversity values were *An. albimanus* ($DH = 0.918$, $\pi = 0.003$), *An. triannulatus* ($DH = 0.902$, $\pi = 0.005$) and *An. oswaldoi* B ($DH = 0.900$; $\pi = 0.009$). The neutrality tests Tajima'D and Fu's F_s yielded negative values, suggesting that the

populations of *An. nuneztovari*, *An. albimanus* and *An. triannulatus* went through a process of population expansion. The values obtained in the estimators of genetic differentiation F_{ST} and gene flow Nm , in general for the species *An. nuneztovari*, *An. albimanus* and *An. triannulatus* indicate that the populations of these species are genetically similar. The Bayesian analysis shows each species as a monofiletico clade and revealed two genetic lineages for *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles oswaldoi* B, *Anopheles triannulatus*. **Conclusion.** The mitochondrial gene *COI* is a useful tool for accurate molecular taxonomic identification of *Anopheles* species; but it also allows for studies of genetic diversity, population structure, and phylogenetic analysis, important aspects for the epidemiology and control of malaria.

KEY WORDS: *Anopheles*, *Nyssorhynchus*, *COI*, Barcode, taxonomic identification and genetic diversity.