

Evaluación de la persistencia de una formulación comercial de *Bacillus sphaericus* en criaderos naturales de anofelinos vectores de malaria en estado Bolívar, Venezuela

Jorge E. Moreno^{1*}, Porfirio Acevedo², Ángela Martínez², Víctor Sanchez¹ & Luis Petterson¹

El municipio Sifontes del estado Bolívar es la principal área endémica a malaria de Venezuela. Durante los últimos cinco años se ha reportado en este municipio un promedio anual cercano a 15 mil casos, alcanzándose durante 2009 la cifra de 20.282, lo que constituye una situación de epidemia. En este municipio se evaluó la persistencia de una formulación comercial de *Bacillus sphaericus* Neide (Vectolex CG 7,5%) en criaderos naturales de *Anopheles marajoara*, *An. triannulatus* y *An. braziliensis*. Para ello se realizaron dos experimentos en los cuales se evaluaron las dosis de 2 y 3 gr/m² durante 60 y 90 días. Los resultados indican que hay diferencias en la persistencia por tipo de criadero y especie de anofelino. La tendencia general para todas las especies indica que el porcentaje de reducción de la población larvaria fue de 100% durante la primera semana, luego disminuyó paulatinamente hasta más o menos 40% después de los 28 días, para luego recuperarse a alrededor de 60% a los 45 días, manteniéndose así hasta el día 90 con ambas dosis. Este comportamiento es más evidente para *An. marajoara*, mientras que con *An. triannulatus* la eficacia se mantiene alrededor de 80% durante 90 días con 3 gr/m². Sobre *An. braziliensis*, la eficacia se mantiene en 100% hasta el día 14 con ambas concentraciones, para luego caer abruptamente sin recuperación. Es la primera vez que se evalúa *B. sphaericus* sobre estas especies de anofelinos en Venezuela, considerándose estos resultados muy prometedores para el control de vectores.

Palabras clave: *Bacillus sphaericus*, persistencia, malaria, vectores, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La malaria es de naturaleza endemo-epidémica en el estado Bolívar. Esta enfermedad irrumpe con fuerza en el estado a partir del brote de El Dorado en 1988 con 30.690 mil casos, 66% de la malaria del país en ese año, manteniéndose así hasta 1992 cuando cae a 11.679 casos. En el decenio 1993-2003 hubo en promedio un poco más de ocho mil casos por año, pero entre 2004 y 2009 el promedio anual se elevó a 27.536 casos, cerrando el último año con más de 30 mil, lo que equivale a 85% de la malaria de Venezuela. Entre 1989 y 2009, en promedio 47% de la

malaria del estado Bolívar se generó en el municipio Sifontes, ubicado en el noreste del estado, por lo que este municipio es considerado uno de los principales focos de malaria en Venezuela. En el año 2004 se inicia una epidemia en el municipio con más de 15 mil casos, la cual se mantiene hasta 2009 con un promedio de 15 mil casos por año en ese lapso, cerrando 2009 con 20.282 casos, 67% de la malaria del estado. La fórmula parasitaria promedio entre 2004 y 2009 arroja 77% para *Plasmodium vivax*, 20% para *P. falciparum* y menos de 2% para infecciones mixtas. A partir de 2003, poco después de reportada su reaparición en el estado, hasta 2009 se han registrado 218 casos de *P. malariae* (Pacheco *et al.*, 2001).

El municipio Sifontes constituye un foco meso-endémico de malaria inestable, donde la transmisión ocurre durante todo el año con brotes epidémicos provocados principalmente por factores

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

² Dirección de Salud Ambiental del estado Bolívar, Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela.

*Autor de correspondencia: joreremo@yahoo.com

antrópicos. Por tal motivo esta zona es considerada de alto riesgo a malaria (Ach , 1998). La actividad económica principal de la región, la minería aurífera, parece estar íntimamente relacionada con la morbilidad mal rica, debido a la fuerte intervención ambiental propiciada por el uso inadecuado de la tierra. La alteración del suelo crea ambientes propicios para la cría de anofelinos y a la vez induce cambios en el patrón de comportamiento de las especies. Debido a la estrecha relación entre minería y malaria, ésta ha sido catalogada en la zona como una enfermedad ocupacional (Ach , 1998).

Acercas de los vectores de malaria, en este foco han sido involucradas dos especies en la transmisión, *Anopheles darlingi* y *An. marajoara*, teniéndose a *An. nuneztovari* como un vector emergente en potencia por su abundancia y ubicuidad (Moreno *et al.*, 2004; 2007). Los huecos de minas hechos por los mineros, han sido descritos como los principales criaderos de anofelinos en el  rea (Moreno *et al.*, 2000)

Las estrategias clásicas de control de vectores, fundamentadas en el rociamiento intra-domiciliario de insecticidas y las nebulizaciones espaciales, han resultado insuficientes para resolver el problema, debido principalmente al comportamiento exofílico de los vectores y al fenómeno de la resistencia a los insecticidas, principalmente a los piretroides (Molina *et al.*, 1997). A esto se le suman factores sociales propios de las comunidades mineras, tales como viviendas provisionales que no poseen superficies adecuadas para el rociamiento de insecticida, hábitos laborales que exponen a la gente a la picada de los mosquitos y alta movilidad entre localidades. Esta problemática ha obligado la búsqueda de nuevas estrategias de control, dentro de un enfoque de control integrado basado en el conocimiento de la ecología de las especies, y basado en el concepto de control selectivo de vectores el cual incluye opciones tales como el control de los criaderos, el control biológico de vectores y el uso de mosquiteros impregnados con insecticida (Berti & Zimmerman, 1998; OPS, 1999). Dentro de este orden de ideas se diseño un estudio con la finalidad de evaluar el impacto de la introducción del agente de control biológico *Bacillus sphaericus* Neide (Bsp) sobre las poblaciones de mosquitos, el cual comienza con la medición de la persistencia del producto en criaderos naturales de anofelinos, un aspecto vital en la viabilidad de un programa de control integrado de vectores, basado en la aplicación de biolarvicidas. En este trabajo se presentan

los resultados de la evaluación de la presentación comercial de *B. sphaericus* Vectolex[®] CG 7,5%, en criaderos naturales de anofelinos y se discuten sus alcances para el control de la malaria.

MATERIALES Y METODOS

 rea de estudio

El municipio Sifontes del estado Bolívar abarca 24.392 km² y está ubicado en el extremo oriental del estado (lat 6^o 00' -7^o 54' N, long 60^o 44' -61^o 39' W). Desde el punto de vista del relieve, en este municipio se distinguen dos tipos de paisaje, sabanas al norte y llanos cubiertos por selva al sur, ambos incluidos dentro de la región fisiogeogr fica Sabanas de Guayana, que son áreas de sabanas con topografía ondulada de variada intensidad, cuya altura varía entre 100 y 500 msm (Hernández Grillet, 1987). Este territorio abarca casi en su totalidad la cuenca del Cuyun -Yuruari, formada por la confluencia de dos río del mismo nombre y que tiene una extensión de 50.000 km², de los cuales aproximadamente 12.000 se encuentran fuera del territorio venezolano. Esta zona presenta un tipo climático de sabana, con ocho a nueve meses de lluvia, estando la temporada más lluviosa entre abril y septiembre con un pico en junio, y una temporada seca o menos lluviosa entre octubre y marzo, siendo febrero el mes más seco. La temperatura media mensual fluctúa entre 22 y 26^oC. Según la clasificación de Holdridge, referida por Hernández Grillet (1987) la zona está dominada por vegetación tipo bosque húmedo y sabanas, distinguiéndose dos categorías de bosque, bosque medio al norte y oeste y bosque denso al sureste del municipio. Desde el punto de vista eco-epidemiológico la zona entra en la categoría de malaria en bosques bajos interiores (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997; Osborn *et al.*, 2004). El  rea se encuentra considerablemente afectada por actividades antrópicas tales como la minería, la explotación maderera y la ganadería, siendo sus principales manifestaciones la disminución de cobertura vegetal, la fragmentación de hábitat, la sedimentación de los ríos, la contaminación del agua con mercurio y la erosión del suelo (Rodríguez, 1999).

Diseño experimental

Este estudio se ajusta a la fase II de la secuencia de estadios de evaluación propuestos por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud

(WHO, 2005). Siguiendo el procedimiento estándar propuesto por el protocolo, para cada bioensayo, en los criaderos seleccionados, se establecieron tres parcelas experimentales o replicas, por cada tratamiento y por el control, siendo un tratamiento una dosis (gr/m^2) del producto aplicado. Se evaluaron dosis de 2 y 3 gr/m^2 en dos bioensayos de la presentación granulada de *B. sphaericus* Vectolex® CG 7,5%, aplicado con la mano en parcelas de 10 metros por lado. Las parcelas fueron ubicadas dentro del criadero de manera tal que fueran lo mas homogéneas posible, en cuanto a características físicas y ecológicas tales como exposición solar, cobertura vegetal y profundidad. Las parcelas fueron dispuestas en un gradiente ascendente por tratamiento, comenzando por los controles y ascendiendo en las concentraciones, para evitar contaminaciones al control y entre concentraciones.

Características de los de criaderos

Los criaderos fueron seleccionados en función de su homogeneidad física, estabilidad, temporalidad y abundancia de larvas, realizándose bioensayos en dos criaderos tipos laguna y un herbazal, identificados previamente como criaderos de *An. triannulatus*, *An. braziliensis* y *An. marajoara* (Moreno *et al.*, 2000).

Las lagunas son cuerpos de aguas estancadas, permanentes, de origen natural, completamente soleadas y ubicadas en ambientes de sabana. El sustrato es variable con predominio de los tipos arenoso y franco arenoso, el color del agua varía entre ámbar y cristalina, dependiendo de la época del año. Los valores fisico-químicos promedio medidos previamente en las lagunas fueron 29,8°C para la temperatura del agua, 52,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en la conductividad eléctrica, 6,2 el pH y 31,4 mg/L el total de sólidos disueltos (TDS). La vegetación hidrófila esta dominada por plantas enraizadas y flotantes, perteneciente a los géneros *Mayaca*, *Eleocharis* y *Ludwigia*, en orden de magnitud, acompañadas por *Utricularia*, *Salvinia* y Alga Verde Filamentosa (AVF). El criadero tipo herbazal inundado es originado por acumulación de agua de lluvia en un suelo limoso poco permeable completamente expuesto al sol, con sustrato de turbera, con aporte de abundante materia orgánica en descomposición. Este cubre un área de aproximadamente 50 hectáreas con una lámina de agua poco profunda, alrededor de 50 cm. en los lugares de mayor profundidad. Su característica principal es que está cubierto en más de 90% por *Eleocharis*, con presencia de *Utricularia*, *Mayaca*, *Ludwigia*

y AVF hacia las orillas. Su dinámica hídrica es de agua estancada permanente, aunque durante sequías extremas pueden secarse completamente. Generalmente el agua es de color ámbar. Durante estudios previos de caracterización de criaderos se registraron valores promedio de temperatura de 29,1°C, pH de 5,7, conductividad de 51,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y TDS de 26,8 mg/L .

Toma de muestras

Se realizó un muestreo con reemplazo, tomándose en cada evaluación una muestra de 20 cucharonzos por parcela, devolviéndose las larvas al criadero después de ser contadas e identificadas. La evaluación pre-aplicación se realizo el día 0, el mismo día de la aplicación. Luego se evaluó los días 2, 4, 7, 14, 21, 28 y 35 después de la aplicación, y así sucesivamente cada 7 días hasta los días 60 y 90 en cada caso. El porcentaje de reducción de larvas de III y IV estadio, fue calculado mediante la formula de Mulla que indica que el Porcentaje de Reducción será igual a $100 - [(C1/C2 \times T2/T1)100]$, donde C1 = control antes de la aplicación, C2 = control después de la aplicación, T1 = tratamiento antes de la aplicación, T2 = tratamiento después de la aplicación (Mulla *et al.*, 1971; 1988). Debido a la presencia de más de una especie de anofelino en los criaderos, las larvas fueron identificadas vivas *in situ*, mediante la observación en el microscopio de caracteres taxonómicos conspicuos que caracterizan a cada una de estas especies y permiten distinguirlas entre sí con facilidad mediante el uso de las claves taxonómicas de Faran & Linthicum (1981) y Navarro (1996).

Análisis estadístico

De acuerdo al protocolo estándar (WHO, 2005), las diferencias entre tratamientos y especies, así como la interacción entre ambas variables, fueron analizados mediante un análisis de varianza de dos factores realizado sobre los porcentajes de reducción como variable dependiente, factorizados por dosis y especies, y luego de ser sometidos a la transformación arcoseno. El análisis fue realizado con el programa SPSS for Windows versión 10.0 (SPSS Inc., 2000).

RESULTADOS

Primer bioensayo

Los valores para el número total de larvas colectadas en las tres replicas experimentales del

primer bioensayo, antes y después del tratamiento, para todas las especies juntas y por especie de anofelino son mostrados en la Tabla I. La Fig. 1 correspondiente al primer bioensayo realizado en una laguna, muestra el porcentaje de reducción de larvas de anofelino de tercer y cuarto estadio sin discriminar por especie. En esta figura se observa que hay reducción alrededor de 100% hasta el día 7, manteniéndose alrededor de 80% hasta el día 21 y 60% hasta el día 28, lo cual puede ser considerado bueno en términos de persistencia. Después de una ligera caída, se manifiesta una fuerte recuperación de 60% de reducción en la dosis de 2 gr/m² a los 60 días y 80% para 3 gr/m² a los 45 días, manteniéndose ambas concentraciones alrededor de este valor hasta los 90 días.

La Fig. 2 muestra la eficacia del producto sobre *An. marajoara*. Al graficar el efecto por especie, se hace evidente que la tendencia descrita en la figura 1 para las larvas de tercer y cuarto estadio, se debe fundamentalmente a esta especie, dada la similitud entre ambas figuras. En este caso, igualmente el porcentaje de reducción para las larvas de *An. marajoara* se mantiene hasta el día 7 en 100% para 2 gr/m² y sobre 95% para 3 gr/m², luego ambas dosis caen a alrededor de 80% el día 21 y a 60% el día 28, para mostrar una recuperación a los 60 y 45 días para 2 y 3 gr/m² respectivamente, luego de una fuerte caída. En el caso de *An. triannulatus*, el comportamiento de la persistencia es muy diferente, en la Fig. 3 se aprecia que luego de los siete primeros días con 100% de reducción, esta se mantiene alrededor de 80%

hasta el día 90 para 3 gr/m², mientras que muestra un comportamiento bastante irregular para 2 gr/m².

Segundo bioensayo

Los valores para el número total de larvas de *An. braziliensis* colectadas en las tres replicas experimentales del segundo bioensayo, antes y después del tratamiento hasta el día 60, son mostrados en la Tabla I. La Fig. 4 muestra como, a diferencia de los anteriores, si bien la eficacia del producto se mantiene en 100% hasta el día 14 con ambas dosis, los resultados son más discretos que los anteriores, debido a que el porcentaje de reducción cae bruscamente y se mantiene alrededor del 60% del día 21 al 28 para 2 gr/m², mientras que con 3 gr/m² la caída es más pronunciada manteniéndose solo hasta el día 28 por debajo de 40%.

Análisis de la varianza

La comparación entre tratamientos y especies en cada bioensayo realizado mediante análisis de varianza de dos factores, con las dosis de Vectolex® CG y las especies de anofelinos como factores independientes, permiten evaluar la eficacia de las dosis aplicadas y observar el efecto que éstas tienen sobre las especies de mosquitos. De esta manera, en el bioensayo 1, en cual se evaluaron dosis de 2 y 3 gr/m² sobre *An. marajoara* y *An. triannulatus*, el análisis de varianza muestra que únicamente el factor especie fue altamente significativo ($F = 74,286; P = 0,000$), mientras que ni el factor dosis ($F = 1,648; P = 0,207$)

Tabla I. Número total de larvas de III-IV estadio colectadas en las tres réplicas experimentales antes (día 0) y después del tratamiento con 2 y 3 g/m² de Vectolex® CG 7,5% por especie de anofelino.

Día	<i>Anopheles</i> sp.		<i>An. marajoara</i>		<i>An. triannulatus</i>		<i>An. braziliensis</i>	
	2gr	3gr	2gr	3gr	2gr	3gr	2gr	3gr
0	83	106	79	96	5	13	29	7
2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	4	0	4	0	0	0	0
14	22	22	27	16	4	6	0	0
21	32	19	24	14	6	5	3	1
28	40	49	30	39	9	8	5	2
35	61	98	48	76	12	11	6	4
45	68	23	58	18	7	1	15	8
60	25	31	21	24	2	3	1	1
90	38	63	22	57	15	4	-	-

Fig. 1. Porcentaje reducción de larvas de III-IV estadio de *Anopheles* sp. en laguna tratada con Vectolex® CG 7,5%.

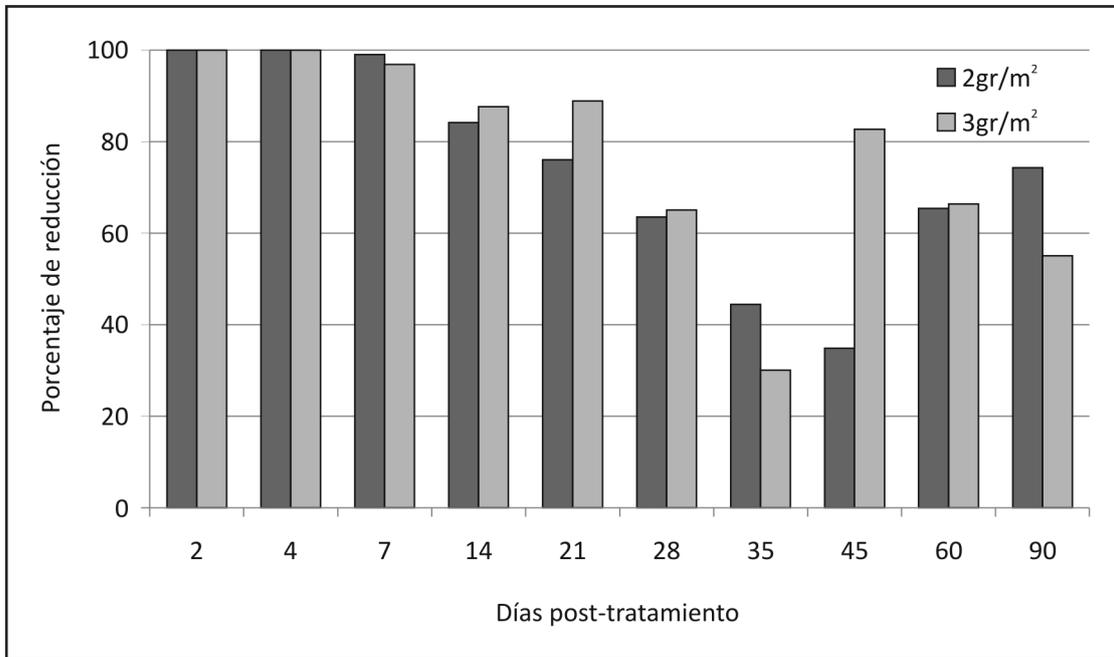


Fig. 2. Porcentaje reducción de larvas de III-IV estadio de *Anopheles marajoara* en laguna tratada con Vectolex® CG 7,5%.

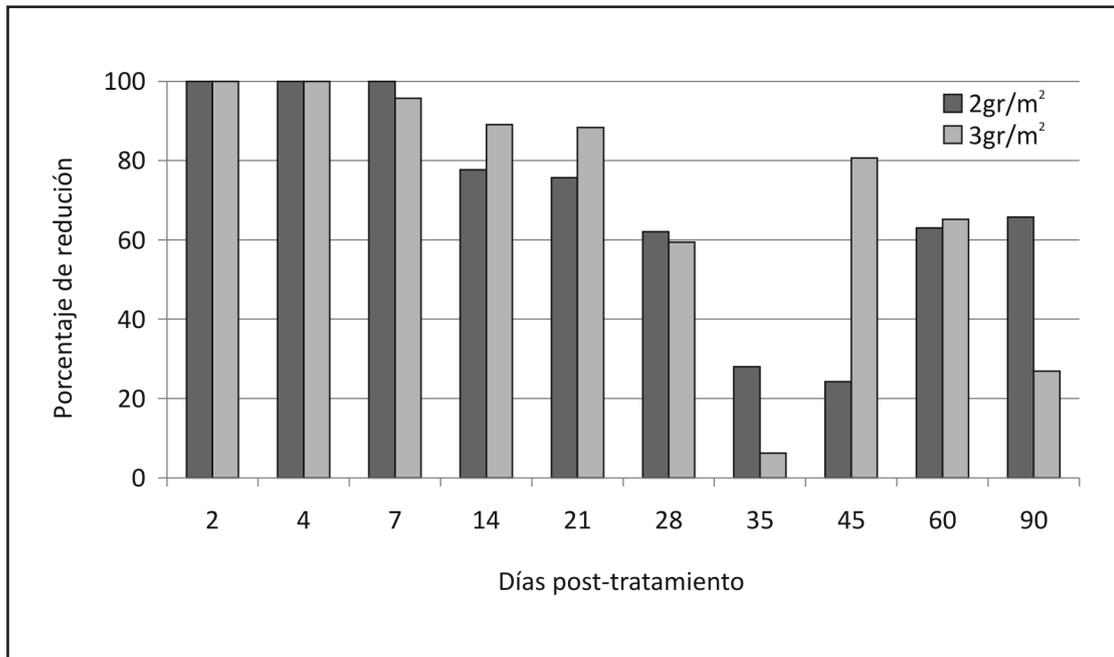


Fig. 3. Porcentaje reducción de larvas de III-IV estadio de *Anopheles triannulatus* en laguna tratada con Vectolex® CG 7,5.

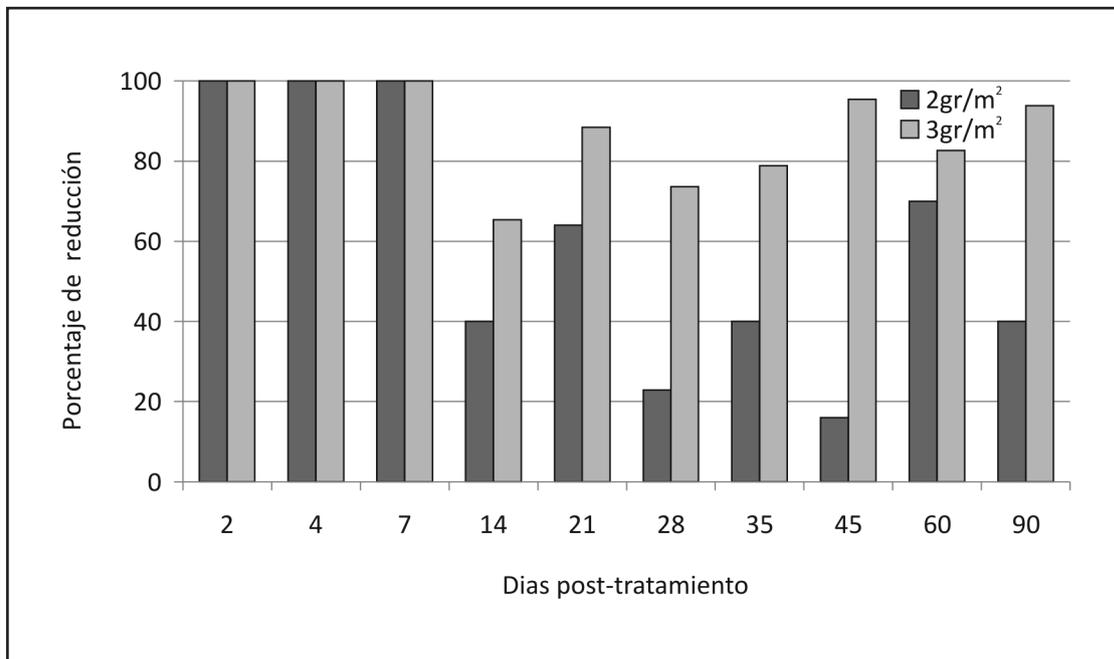
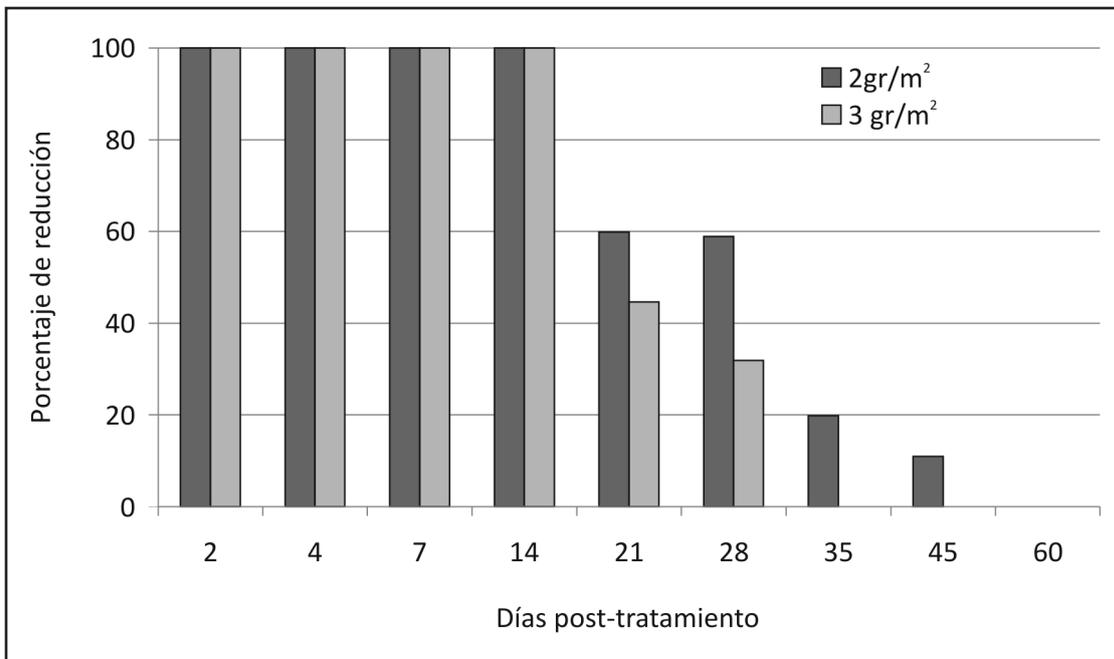


Fig. 4. Porcentaje de reducción de larvas de III y IV estadio de *Anopheles braziliensis* en pastizal tratado con Vectolex® CG 7,5%.



ni la interacción dosis por especie ($F = 1,501$; $P = 0,228$) fueron significativos, lo cual conduce a que las diferencias observadas en los porcentajes de reducción son únicamente debido a las especies, no habiendo suficiente evidencia para afirmar que sean debido a las dosis aplicadas.

DISCUSIÓN

En general los resultados obtenidos en los dos bioensayos, para todas las especies evaluadas, pueden considerarse buenos en términos de persistencia del producto en los criaderos. Los resultados del primer bioensayo son prometedores desde el punto de vista del control. Una eficacia superior al 60% hasta el día 28 puede considerarse viable dentro de un programa de control, además de la recuperación mostrada a partir de los 45 días, lo cual evidencia que el proceso de reciclaje se está llevando a cabo en los criaderos, característica fundamental de este producto que constituye una de sus principales bondades (Des Rochers & García, 1984). En ambas especies, el biolarvicida se mantiene activo hasta los 90 días, con un mejor desempeño en *An. triannulatus*, lo cual posibilita el uso de este producto en el control. Por otro lado, las gráficas parecen evidenciar diferencias entre las especies en la respuesta a las dosis aplicadas, no obstante a que el análisis de varianza niega esta posibilidad.

En el otro bioensayo, los resultados sobre *An. braziliensis* son muy buenos durante las dos primeras semanas, manteniéndose en 100% de reducción en este lapso, para luego desplomarse en forma abrupta, lo cual dificulta la interpretación de los resultados. Una de las causas de este comportamiento, puede ser la baja densidad de larvas de anofelinos en los criaderos, tal como ha sido descrito previamente para esta zona por Moreno *et al.* (2000), lo cual puede causar sesgo en el muestreo. Por esta razón, una alternativa para la interpretación de los resultados puede ser la observación de la densidad relativa de larvas, es decir, la densidad antes y después de la aplicación del producto. A pesar de ello, los resultados son importantes debido a que es la primera vez que se evalúa este producto sobre esta especie en Venezuela. Por otro lado, es necesario seguir evaluando la eficacia del biolarvicida sobre *An. braziliensis*, teniendo en cuenta que esta especie ha sido señalada como vectora de malaria en la región de sabanas altas del país (Osborn *et al.*, 2006)

El análisis de varianza, provee de una herramienta muy útil que permite el examen detallado de los resultados y la comparación exhaustiva del efecto de los tratamientos sobre las diferentes especies de anofelinos no siempre evidentes en los gráficos de persistencia. En este caso, los resultados del análisis no revelaron interacciones significativas entre las dosis y las especies, lo cual significa que no hay evidencia suficiente para señalar una respuesta diferencial de las especies de mosquitos a las diferentes dosis aplicadas, que sugiera la existencia de susceptibilidad específica al biolarvicida. No obstante, se considera que este es un aspecto a seguir siendo investigado.

Más allá de los resultados alcanzados en los bioensayos, hay varios aspectos positivos que destacan en los experimentos realizados. El primer bioensayo, permite establecer una persistencia de alrededor de 28 días con recuperación de la eficacia a los 45 días para *An. marajoara* con ambas dosis, y de 90 días por encima de 80% para *An. triannulatus* con 3 gr/m², lo cual es excelente, siendo en ambos casos igualmente efectivo, lo que es muy importante si se tiene en cuenta que *An. marajoara* es un vector importante de malaria en esta área (Moreno *et al.*, 2007). Resultados muy similares, de mas o menos 28 días de persistencia, fueron obtenidos con esta misma formulación del producto por Berti *et al.* (2002) aplicado contra *An. aquasalis* en el estado Sucre a las mismas concentraciones. A diferencia de este trabajo, ellos solo obtuvieron efectividad de 100% solo hasta el día 4, mientras que en nuestro caso se mantuvo hasta el día 7 con ambas especies. Igualmente, en otro trabajo Berti & González (2004) obtuvieron reducción larval superior al 80% durante 24 días, sobre *An. aquasalis* en Sucre, pero con la formulación WDG a 51% de Vectolex, que es una formulación de una concentración de ingrediente activo mucho más elevada que ésta. A la luz de estos resultados, los nuestros pueden ser considerados muy buenos.

En el caso de *An. braziliensis*, los resultados son mas modestos, se alcanzó una persistencia de 21 días de alrededor de 60%, no obstante, destaca en esta especie la persistencia de 100% alcanzada hasta el día 14 en el herbazal, resultado similar al obtenido para *An. triannulatus* en el mismo, lo que sugiere diferencias notables en la efectividad del producto de acuerdo al tipo de criadero.

Por ultimo, además de los resultados prometedores para el control de vectores alcanzados,

hay que destacar el hecho de que es la primera vez que este producto se evalúa sobre especies estas especies de anofelinos, y es la primera vez que se evalúan biolarvicidas en esta área endémica, lo que constituye un paso fundamental en el diseño e implementación de nuevas estrategias de control de malaria en ese foco y abre nuevas expectativas en la lucha contra esta enfermedad en esta región del país.

AGRADECIMIENTOS

Al personal administrativo y gerencial de la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar por el apoyo logístico recibido durante todas las fases de ejecución del proyecto y a las personas en el campo quienes permitieron la realización de los experimentos en sus propiedades. Este proyecto fue financiado por Fonacit bajo el contrato N° 2002000410.

Evaluation of the persistence of a commercial formulation of *Bacillus sphaericus* in malaria vectors anopheline larval habitats in Bolívar state, Venezuela

SUMMARY

Sifontes municipality in Bolivar state is the main malaria endemic area in Venezuela. During the last five years an annual average of 14,000 cases has been reported, reaching 13,450 during 2008, resulting in an epidemic situation. A commercial formulation of *Bacillus sphaericus* Neide (Vectolex CG 7.5%), was evaluated in larval habitats of *Anopheles marajoara*, *An. triannulatus* and *An. braziliensis*. Two experiments were carried out in a lagoon and a pasture inundated area, 2 and 3 gr/m² doses were evaluated during 60 and 90 days. The results point out that there are differences in the persistence depending on the type of larval habitat and anopheline species. The general trend indicated that for all the species the persistence of the Vectolex, therefore the reduction of the larval population was 100% during the first week. However, it fell under 40% after day 28, then recovered by day 45, and remaining around 40% for 90 days with both doses. A similar pattern was observed for *An. marajoara*, whereas for *An. triannulatus* the efficacy remained around 80% during 90 days only at 3 gr/m². With *An. braziliensis* there was 100% persistence until day 14 with both doses, for then fell abruptly without recovering. This is the first time that *B. sphaericus* was evaluated for these anopheline species in Venezuela, considering these results promissory for the malaria control program.

Key words: *Bacillus sphaericus*, persistence, malaria, vectors, Venezuela.

REFERENCIAS

- Aché R. A. (1998). Situación actual de la malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **38**: 68-72.
- Berti J. & Zimmerman R. (1998). Métodos para el control integrado de los vectores de la malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **37**: 123-136.
- Berti M. J. & Gonzáles J. E. (2004). Evaluación de la efectividad y persistencia de una nueva formulación de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en criaderos naturales del estado Sucre, Venezuela. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **44**: 21-27.
- Berti M. J., Ramirez X., Gonzales J. E. & Herrera M. (2002). Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en criaderos naturales del estado Sucre, Venezuela. *Entomotopica.* **17**: 1-5.
- Des Rochers B. & García R. (1984). Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. *Mosquito News.* **44**: 160-165.
- Faran M. E. & Linthicum K. J. (1981). A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematic.* **13**: 1-81.
- Hernandez Grillet R. (1987). *Geografía del estado Bolívar*. Academia Nacional de la Historia, CVG Siderúrgica del Orinoco, C.A. Italgráfica, S.R.L. Caracas, Venezuela.
- Molina de F. D., Saume R. F., Bisset J. *et al.*, (1997). Establecimiento de la línea de susceptibilidad de la fase adulta de *Anopheles* spp. a insecticidas químicos. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **37**: 55-69.
- 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., Rubio-Palis Y., Sánchez V. & Mariany D. (2004). Primer registro de *Anopheles*

- (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldon, 1940 (Díptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotropica*. **19**: 55-58.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Paez E., Perez E. & Sanchez 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.
- Mulla M., Norland R., Fanara D., Darwazeh H. & Mekean D. (1971). Control of chironomid midges in recreational lakes. *J. Econ. Entomol.* **64**: 300-307.
- Mulla M. S., Axelrod H., Darwazeh H. A. & Matanmi B. A. (1988). Efficacy and longevity of *Bacillus sphaericus* 2362 formulations for control of mosquito larvae in dairy wastewater lagoons. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* **4**: 448-452.
- 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. San. Amb.* **35**: 25-43.
- OPS (1999). *Informe de la situación de los programas de malaria en las Américas* (Organización Panamericana de la Salud). 41° Concejo Directivo, CD41/INF/1. Washington, D.C.
- Pacheco M., Villegas L., Páez E. & Moreno J. (2001). Re-emergencia de *Plasmodium malariae* en el estado Bolívar. *Bol. Vzlan. Infectol.* **11**: 5
- Osborn F. R., Rubio-Palis Y., Herrera M., Figuera A. & Moreno J. E. (2004). Caracterización ecoregional de los vectores de malaria en Venezuela. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **44**: 77-92.
- Rodriguez A. R. (1999). *Conservación de humedales de Venezuela. Inventario, diagnóstico ambiental y estrategia*. Comité Venezolano de la UICN. Caracas, Venezuela.
- Rubio-Palis Y. & Zimmerman R. H. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Entomol.* **34**: 499-510.
- WHO (2005). *Draft. Guideline for laboratory and field testing of mosquito larvicides* (World Health Organization). WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, Geneva.

Recibido el 13/12/2009
Aceptado el 10/05/2010

