

Evaluación preliminar de la eficiencia de *Bacillus sphaericus* en un área endémica a malaria del estado Bolívar, Venezuela

Preliminary evaluation of the effectiveness of Bacillus sphaericus in an malaria-endemic region in Bolívar state, Venezuela

Jorge E. Moreno^{1*}, Ángela Martínez², Porfirio Acevedo², Víctor Sánchez³, William Amaya³, Luis Petterson¹, José Guevara² & Yorvis Ascanio²

RESUMEN

El municipio Sifontes del estado Bolívar es la principal área endémica a malaria de Venezuela. Durante los cinco años anteriores al estudio se reportaron allí un promedio anual de 14 mil casos, alcanzándose en 2009 la cifra de 19.408, constituyendo una situación de epidemia. En la búsqueda de estrategias alternativas al uso de insecticidas, se evaluó la eficiencia para el control de malaria de una formulación comercial de *Bacillus sphaericus* Neide (VectoLex® CG 7,5%). Entre mayo 2010 y mayo de 2011 se aplicó biolarvicida con motomochila (Solo®) a dosis de 20-30 kg/ha a frecuencia mensual en todos los criaderos de *Anopheles darlingi*, *An. marajoara* y *An. nuneztovari* ubicados alrededor de las viviendas de cuatro comunidades de la parroquia San Isidro de este municipio, acompañadas de colectas de anofelinos adultos con atrayente humano y trampa de luz CDC y ultravioleta. Después de 48 semanas de aplicación, la reducción de 80% de la malaria en el área, más la reducción de la densidad de larvas en los criaderos, muestran que el biolarvicida es eficiente para controlar malaria. Los resultados también sugieren que la prevalencia de larvas es un buen indicador en un programa de control de vectores basado en la aplicación de biolarvicida, no así la de adultos, cuya abundancia no se corresponde con la de larvas. Es la primera vez que se evalúa la eficiencia de *B. sphaericus* para controlar malaria en Venezuela, considerándose estos resultados prometedores, si el tratamiento de criaderos con biolarvicida es selectivo y se hace a la cobertura, frecuencia y dosis correctas, e integrado a otras estrategias de control de vectores.

Palabras clave: Malaria, control de vectores, *Anopheles darlingi*, *An. marajoara*, *An. nuneztovari*, *Bacillus sphaericus*, Venezuela.

INTRDUCCIÓN

La malaria es de naturaleza endemo-epidémica en el estado Bolívar. Según la Dirección

SUMMARY

The Sifontes municipality in Bolivar state is the principal malaria-endemic region in Venezuela. During the five years prior to the study an annual average of 14,000 cases was reported reaching an epidemic level of 19,408 cases in 2009. As part of the search for vector control measures that could be used as alternatives to insecticides, a commercial formulation of *Bacillus sphaericus* Neide (VectoLex® CG 7.5%) was evaluated. Between May 2010 and May 2011 monthly dosages of 20-30 kg/ha of Vectolex were sprayed using a motorized backpack (Solo®) in larval *Anopheles darlingi*, *An. marajoara* and *An. nuneztovari* habitats close to houses in four communities in the parish of San Isidro, Sifontes municipality. In parallel, adult anophelines were captured using human baits, CDC light traps and ultraviolet light traps. After 48 weeks of application there was an 80% reduction in malaria as well as a decrease in larval density demonstrating the effectiveness of *B. sphaericus* for the control of this disease. Moreover, the results suggest that larval prevalence is good indicator for biolarvicide based malaria control programs whereas the abundance of adults, which does not correlate with larval abundance, is not. This is the first time that the effectiveness of *B. sphaericus* for malaria control has been evaluated in Venezuela. These results show that spraying larval habitats for malaria control can be effective when integrated with other vector control strategies if the treatment is selective and carried out at the correct frequency and dosage in order to ensure adequate coverage of the larval habitat.

Key words: Malaria, vector control, *Anopheles darlingi*, *An. marajoara*, *An. nuneztovari*, *Bacillus sphaericus*, Venezuela.

General de Salud Ambiental (DGSA) de 45.155 casos de malaria que se generaron durante 2010 en Venezuela, 39.740 (88%) correspondieron al estado Bolívar, y de estos 21.352 (47%) al municipio

¹ Centro de Investigaciones de Campo "Dr. Francesco Vitanza", Tumeremo, Bolívar. S.A. Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon".

² Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar, Instituto de Salud Pública del Estado Bolívar, Ciudad Bolívar.

³ Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas, Maracay, Aragua. S.A. Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon".

*Autor de correspondencia: jorermo@yahoo.com

Sifontes (DGSA, 2010). De acuerdo a la información de la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar (DSAEB) entre 1990 y 2010, 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 el principal foco de la malaria en Venezuela (DSAEB, datos no publicados). Asimismo, la fórmula parasitaria promedio en el municipio en ese lapso fue de 74% para *Plasmodium vivax*, 26% para *P. falciparum* y menos de 1% para infecciones mixtas. Entre 2001 y 2010 solo se registraron 243 casos de *P. malariae*.

Según Grillet *et al.* (2009) un foco caliente de malaria es un área de transmisión activa de malaria con una alta agregación de casos producto de condiciones eco-epidemiológicas locales que promueven una continua transmisión del parásito. En este sentido, del total de casos generados durante 2010 en el municipio Sifontes, 15.767 (73%) correspondieron a la parroquia San Isidro, ubicada al sur del municipio en el límite con el municipio Gran Sabana, por lo que se puede considerar a esta parroquia el foco caliente de la malaria en el municipio, el estado Bolívar y Venezuela en los últimos años. La razón principal de este problema la constituye la minería artesanal de oro, actividad estrechamente relacionada con la morbilidad malarica, debido a que la deforestación y la alteración del suelo crean ambientes propicios para la reproducción de anofelinos vectores, por lo que en esta área la malaria puede ser definida como una enfermedad ocupacional (Aché, 1998; Moreno *et al.*, 2000).

Acerca de los vectores de malaria, en este foco han sido involucradas dos especies de anofelinos en la transmisión, *Anopheles darlingi* Root y *An. marajoara* Galvao & Damasceno, teniéndose a *An. nuneztovari* Gabaldon *sensu latu* como un vector potencial por su abundancia y ubicuidad (Moreno *et al.*, 2004; 2007). Las actividades tradicionales de control de malaria, tales como rociamientos de insecticidas intradomicilio y nebulizaciones al espacio, han fracasado debido en gran medida a problemas operativos en las aplicaciones y a la resistencia a los insecticidas en los anofelinos. Por tal razón, se están explorando nuevos métodos de control como la aplicación de biolarvicida en los criaderos de anofelinos, específicamente *Bacillus sphaericus* Neide (Bs).

La efectividad operacional de Bs para el control de larvas de *Anopheles* ha sido probada

en India y Camerún, mostrando estos estudios la capacidad del biolarvicida para reducir la prevalencia de larvas en los criaderos y la abundancia de los mosquitos adultos vectores (Barbazan *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1994; Sharma & Sharma, 1989). Asimismo, en Zaire, Karch *et al.* (1992) lograron reducir la tasa de picada y la tasa entomológica de inoculación de *An. gambiae* Giles aplicando una formulación comercial de *B. sphaericus*, VectoLex® en los criaderos del vector, de la misma forma que Fillinger & Lindsay (2006) lograron reducir la exposición de la gente a la picada de mosquitos en Kenia, aplicando Bs combinado con *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). En Latinoamérica Bs también ha sido usado en programas de control integrado contra *An. albimanus* Wiedemann en Nicaragua, Honduras y Colombia (Rivera, 1998; Rivera *et al.*, 1998; Suárez, 1999), y para el control de *An. darlingi* en minas de oro de Brasil (Galardo *et al.*, 2013).

En Venezuela los biolarvicidas han sido poco utilizados en programas de control de malaria. Una de las primeras referencias de campo que se tiene en el país de estos productos, ha sido el exitoso programa de control integrado de vectores implementado en el estado Sucre con Bti, donde se lograron disminuir las elevadas tasas de morbilidad por malaria (Zimmerman & Berti, 1994). Luego, son pocas las experiencias en Venezuela con bacilos, hasta los trabajos de evaluación implementados desde 2009 en el municipio Sifontes (Moreno *et al.*, 2010). A partir de entonces, se implementó en el estado Bolívar un programa piloto de control de malaria basado en la aplicación de una presentación granulada de Bs (VectoLex® CG 7,5%). En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación del impacto del biolarvicida sobre las poblaciones de mosquitos y los casos de malaria, es decir, su eficiencia para reducir la morbilidad por esta enfermedad en un área endémica de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

El estudio fue realizado en el foco endémico a malaria de Las Claritas, ubicada en la parroquia San Isidro, en el extremo sur del municipio Sifontes del estado Bolívar (Fig. 1). La demografía general, topografía, paisaje, clima e hidrografía del municipio han sido previamente descritos por Moreno *et al.* (2010), la zona presenta un régimen de lluvias

Fig. 1. Ubicación relativa del municipio Sifontes en Venezuela y del área de estudio en la parroquia San Isidro.



bimodal con un pico mayor en el mes de junio y otro menor en noviembre con un periodo de sequía de febrero a abril. El área de estudio está conformada por pequeños centros poblados ubicados a lo largo de 25 kilómetros de la carretera troncal 10 que conduce a Brasil ($6^{\circ} 11' N$ $61^{\circ} 24W$ - $6^{\circ} 13' N$ $61^{\circ} 21W$). La población, agrupada en los caseríos de Tierra Blanca, Las Manacas, El Granzón, San Marco y algunas viviendas dispersas, es rural estable y está constituida principalmente por los grupos étnicos criollo mestizo e indígena Pemón, así como también una proporción importante de guyaneses. La actividad económica principal es la minería artesanal de oro, que practican en áreas cercanas a la comunidad, el comercio y la agricultura de subsistencia en los grupos indígenas. Esta es una zona boscosa muy húmeda, recorrida por gran cantidad de quebradas y pequeñas líneas de drenaje, que al represarse forman charcas las cuales constituyen los principales criaderos de anofelinos.

Diseño del estudio

Durante un año, de mayo 2010 a mayo 2011, se realizó un estudio no controlado correspondiente a una fase III de la secuencia de estudios de evaluación de biolarvicidas propuesta en el protocolo del Esquema de Evaluación de Plaguicidas de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2005). En el área de estudio seleccionada según el criterio de morbilidad por malaria, se aplicó Bs a ciclo mensual en todos (20) los criaderos de anofelinos existentes. La evaluación pre tratamiento se realizó el mismo día de la primera aplicación, la evaluación pos tratamiento se realizó en nueve criaderos centinelas, en los cuales se hicieron muestreos de larvas a partir de la segunda semana después de la primera aplicación, y luego cada semana hasta la siguiente aplicación. Simultáneamente a la evaluación de criaderos se realizaron colectas de anofelinos adultos y vigilancia epidemiológica.

Descripción de los criaderos

En esta zona las lagunas son abundantes y constituyen los criaderos principales de *An. darlingi*, el vector principal de malaria del área, además de *An. triannulatus* Neiva & Pinto, *An. marajoara* y *An. nuneztovari* s.l. (Moreno *et al.*, 2000; 2004). Estas lagunas, en su mayoría fueron producidas por los movimientos de tierra realizados durante la construcción de la carretera o por el represamiento de las quebradas ocasionado por la actividad minera. Pueden ser de hidropereodo estacional o permanente, dinámica hídrica de aguas estancadas o corriente muy lenta alimentada por pequeñas quebradas, líneas de drenajes y escurrimientos superficiales. Durante el pico de lluvias, en los meses de junio y julio, se pueden presentar un aumento considerable en la corriente, ocasionando el lavado de los criaderos y arrastre de las larvas. La mayoría de las lagunas están rodeadas de vegetación arbórea lo cual produce sombra total o parcial, cualidades que determinan las características físico-químicas del agua, de la vegetación acuática y consecuentemente la presencia de algunas especies de anofelinos. El color aparente del agua varía de ámbar a marrón oscuro dependiendo de la época del año. Los valores físico-químicos promedios medidos en esta charcas durante el estudio fueron de 29,3°C para la temperatura del agua; 46,4 µS/cm la conductividad; 5,9 el pH y 27,1 mg/L de TDS. Puede haber charcas totalmente carentes de vegetación, pero cuando está presente, las hidrófilas dominantes pertenecen a los géneros *Eleocharis*, *Nymphaea* y *Mayaca*, pudiendo haber grupos de gramínea en áreas soleadas.

Aplicación del biolarvicida

El biolarvicida VectoLex® CG, una formulación granulada al 7,5% de *B. sphaericus* (Valent BioScience Corp.) fue aplicado directamente en los criaderos de anofelinos con equipo pulverizador motorizado (motomochila) marca Solo®, a dosis de 20-30 Kg por hectárea, en ciclos de 30-45 días según la persistencia del producto demostrada previamente por Moreno *et al.* (2010).

Muestreo de larvas de anofelinos

Cada criadero centinela fue muestreado a lo largo de todo el estudio con un cucharón de 1,5 litros de capacidad, tomándose en cada evaluación una muestra sin reemplazo de 60 a 80 cucharonazos distribuidos en dos a cuatro puntos de muestreo,

según el tamaño de criadero. Debido a la baja densidad de larvas en esta área, se hizo muestreo dirigido no aleatorio, para maximizar la sensibilidad de la colecta (Fillinger & Lindsay, 2006). Las larvas colectadas fueron transportadas en bolsas de agua al laboratorio para ser identificadas *in vivo* hasta especie mediante las claves taxonómicas de Faran & Linthicum (1981) y Navarro (1996), según la metodología descrita por Moreno *et al.* (2010). Las pupas fueron contadas y colocadas en viales de emergencia para ser identificadas posteriormente en fase adulta, obteniéndose de esta manera la densidad relativa de larvas por especie.

Colecta de mosquitos adultos

Se realizaron colectas de anofelinos adultos a frecuencia mensual con trampas de luz CDC y ultravioleta de octubre 2010 a mayo 2011, y atrayente humano de mayo 2010 a mayo 2011. Las colectas fueron realizadas durante tres noches consecutivas cada mes en cinco viviendas seleccionadas a lo largo del área tratando de mantener la misma locación durante todo el estudio, colocándose en cuatro de las vivienda trampas de luz CDC y ultravioleta, y en la quinta casa atrayente humano. En cada casa se colocó una trampa CDC en un dormitorio y una de luz ultravioleta en el peri domicilio, ambas dejadas allí durante toda la noche entre las 18:00 y 06:00, y recogidas a primeras horas de la mañana siguiente. Las colectas con atrayente humano fueron realizadas de manera voluntaria por cuatro miembros del equipo, previo consentimiento informado, colocándose dos hombres dentro y dos fuera de la casa entre las 18:00 y las 22:00. A todos los atrayentes voluntarios se les garantizó tratamiento antimalárico y asistencia médica inmediata en caso de ser necesario. Los mosquitos colectados fueron identificados hasta especie utilizando las claves taxonómicas de Faran & Linthicum (1981) y Rubio-Palis (2000).

Vigilancia epidemiológica

Los datos de malaria para el estudio fueron suministrados por el Servicio de Vigilancia Epidemiológica de la DSAEB, recogidos mediante búsqueda activa efectuada por visitadores rurales, y búsqueda pasiva de casos captados en los puestos de diagnóstico de la DSAEB ubicados en el área endémica. La verificación del origen geográfico del caso se hizo por medio de una encuesta epidemiológica realiza *in situ* por el supervisor del área. Se considera

un caso confirmado de malaria cuando se tiene un diagnóstico positivo por medio de la técnica estándar de gota gruesa, siendo tratados los casos por la DSAEB según la Pauta Terapéutica Nacional. Los datos fueron suministrados a frecuencia semanal.

RESULTADOS

Abundancia de larvas y mosquitos adultos

En la Tabla I se muestra el resumen de la evaluación entomológica realizada a los criaderos centinela en el lapso comprendido entre mayo de 2010 y mayo de 2011. Se colectaron en total 1.060 larvas de anofelinos, 506 de los instares I-II y 554 de los instares III-IV, de las cuales se identificaron hasta especie 460 (83%), estando estas últimas distribuidas en cinco especies de *Anopheles* más dos larvas de *Chagasia* sp. La especie más abundante en los criaderos fue *An. triannulatus* con 72,2% de las larvas identificadas durante todo el estudio, estando constituido el resto de la muestra por *An. nuneztovari* s.l. (10,9%), *An. darlingi* (5,9%), *An. marajoara* (5,9%) y *An. oswaldoi* (Peryassu) (5,2%). Asimismo, se colectaron 851 mosquitos adultos con todos los métodos distribuidos en cuatro especies de anofelinos (Tabla II). Del total de mosquitos adultos 75% fue colectado con atrayente humano, 24% con trampas de luz CDC y 1% con trampas de luz ultravioleta. En cuanto a abundancia, las proporciones por especie en la colecta fueron similares con atrayente humano y trampas CDC. En general, *An. darlingi* fue la especie predominante con 73% del total colectado con ambos métodos, seguida de *An. nuneztovari* s.l.

con 21% y *An. marajoara* con 4%, mientras que de *An. triannulatus* solo se colectaron tres especímenes y uno de *An. strodei* Root.

Efecto del biolarvicida sobre la abundancia de larvas y mosquitos adultos

Una de las principales características entomológicas de esta área endémica, es la baja densidad de mosquitos, tanto de adultos como larvas durante casi todo el año, lo cual ha sido previamente descrito por Moreno *et al.* (2000, 2007). En la Fig. 2 se muestran la densidad de larvas y tasas de picada de adultos expresadas en mosquitos/hora/hombre (MHH), para *An. darlingi* y *An. nuneztovari* s.l. a lo largo de 52 semanas de evaluación, entre mayo de 2010 y mayo de 2011. La densidad relativa promedio de larvas obtenida a lo largo del estudio fue de 0,18 y 0,33 larvas/100 cucharonadas para la primera y segunda especie, mientras que la densidad inicial del día cero en la semana 19 fue de 3,57 y 5,71 larvas/100 cucharonadas respectivamente, lo cual implica una reducción promedio de 95% por efecto del biolarvicida para ambas especies. Sin embargo, la reducción de larvas no fue uniforme a lo largo de la evaluación, para *An. darlingi* hubo una fuerte reducción luego de la primera aplicación, la cual se mantiene durante 16 semanas hasta la semana 36 a la mitad del estudio, cuando hay una recuperación de los criaderos a un tercio de la densidad inicial aproximadamente durante 11 semanas, y una segunda recuperación al final en las últimas cuatro semanas (Fig. 2). Para *An. nuneztovari* s.l. el patrón es muy similar al anterior, excepto en que la reducción no se

Tabla I. Cantidad de larvas de *Anopheles* colectadas por especie y mes entre mayo 2010 y mayo 2011 en los criaderos centinela del área de estudio.

Mes	Estadios		Total larvas	Total especies III-IV					
	I-II	III-IV		DAR	MAR	TRI	OSW	NUN	NI
Mayo	72	91	163	10	2	44	6	16	13
Junio	121	94	215	0	22	11	2	7	52
Julio	18	4	22	0	0	0	0	1	3
Agosto	7	5	12	0	0	2	1	0	2
Septiembre	8	8	16	4	0	0	0	0	4
Octubre	11	5	16	0	0	4	1	0	0
Noviembre	36	56	92	2	0	35	10	6	3
Diciembre	28	45	73	3	0	29	3	1	9
Enero	98	72	170	2	0	56	0	11	3
Febrero	37	66	103	0	2	58	0	4	2
Marzo	14	14	28	3	0	6	1	1	3
Abril	44	52	96	3	1	47	0	1	0
Mayo	12	42	54	0	0	40	0	2	0
Total	506	554	1060	27	27	332	24	50	94

DAR = *An. darlingi*, MAR = *An. marajoara*, TRI = *An. triannulatus*, OSW = *An. oswaldoi* s.l., NUN = *An. nuneztovari* s.l., NI = No identificados

Tabla II. Cantidad de mosquitos adultos colectados entre mayo 2010 y mayo 2011.

Especie	CDC	TUV	CHU	Total
<i>An. darlingi</i>	151	5	466	622
<i>An. marajoara</i>	16	0	21	37
<i>An. strodei</i>	0	1	0	1
<i>An. triannulatus</i>	1	2	0	3
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	31	0	145	176
No identificados	6	0	6	12
Total	205	8	638	851

CDC: Trampa de luz CDC, TUV: trampa de luz ultravioleta, CHU: colecta con atrayente humano.

manifiesta a partir de la primera, sino de la segunda aplicación (Fig. 2). En general, para ambas especies de anofelino, la reducción en la abundancia con respecto a la primera semana, fue de aproximadamente dos tercios a lo largo de la aplicación, evidenciándose el efecto sucesivo de las aplicaciones de biolarvicida.

La Fig. 2 también muestra de manera simultánea la tasa de picada de hembras adultas de *An. darlingi* y *An. nuneztovari s.l.* colectadas con atrayente humano en el mismo periodo de las aplicaciones de biolarvicida. La tasa de picada para *An. darlingi* fue de 1,9 MHH durante todo el estudio, superior a la reportada previamente por Moreno *et al.* (2007) para el municipio, mientras que la de *An. nuneztovari s.l.* fue de 0,1 MHH, inferior a la reportada por Rubio-Palis *et al.* (2013) para la cuenca del río Caura en el estado Bolívar. De acuerdo al patrón de actividad mostrado en la Fig. 2A, parece haber tres picos en la abundancia de *An. darlingi* a lo largo del estudio, al comienzo en mayo de 2010, en las semanas 45 y 50 correspondientes a los meses de noviembre y diciembre del mismo año, y al final en mayo de 2011, los cuales son meses de transición sequía-lluvia en la región. En cuanto a la segunda especie más colectada, *An. nuneztovari*, esta fue comparativamente poco abundante durante el estudio, detectándose picos en su abundancia durante los meses de mayo y diciembre, similares a los de *An. darlingi* pero menos pronunciados (Fig. 2B), lo que sugiere coincidencia en el patrón de abundancia de ambas especies.

Correspondencia entre la abundancia de larvas y mosquitos adultos

Una forma de observar si el efecto del biolarvicida sobre las larvas se manifiesta sobre las

poblaciones de adultos, es mediante la construcción de un patrón conjunto de abundancia entre larvas y mosquitos adultos (Fig. 2). Sin embargo, uno de los requisitos básicos para realizar esta comparación, es que larvas y adultos sean colectados en la misma escala temporal, lo cual es muy difícil por razones de costo. En este caso los adultos fueron colectados mensualmente mientras que las larvas fueron colectadas cada semana, por lo que en la serie hay más colectas de larvas que de adultos. Otra dificultad para la construcción de un patrón conjunto en este estudio, fue que no hubo congruencia en la abundancia de ambos estadios, la especie más abundante en larvas fue *An. triannulatus*, mientras que para los adultos fue *An. darlingi*, invirtiéndose la relación recíprocamente al invertir los estadios. Por las razones expuestas anteriormente, es difícil verificar en la figura 2 la existencia de un patrón común para ambas series; sin embargo, esta relación parece insinuarse de forma más evidente con *An. darlingi*, cuya abundancia se incrementa tanto en larvas como en adultos hacia la mitad del estudio (Fig. 2A), lo cual no ocurre con *An. nuneztovari s.l.* (Fig. 2B).

Evaluación del impacto del biolarvicida sobre la morbilidad por malaria

En el periodo 2006-2010 hubo en el área bajo tratamiento un promedio de 2.339 casos anuales de malaria. El perfil epidemiológico histórico del área mostrado en la Fig. 3, revela un patrón endemo-epidémico con agudos brotes epidémicos intercalados, que es característico de toda el área endémica y del estado Bolívar. Los picos en la casuística del periodo de estudio son coincidentes con la tendencia mostrada por el promedio histórico, cuyos picos de malaria más severos ocurrieron alrededor de las semanas 20 y 48 de cada año, lo cual sugiere la existencia de un patrón asociado a uno o varios factores crípticos que pudieran ser variables climáticas o patrones migratorios de la población humana.

Para 2009, el año anterior a la intervención con biolarvicida, se originaron en el área 2.424 casos de malaria, superando el umbral de epidemia en la semana 10, permaneciendo así la mayor parte del año con varios brotes epidémicos intercalados y alcanzando un pico máximo en la semana 48 con 23 casos de malaria (Fig. 3). La situación permanece igual hasta la semana 19 de 2010 cuando comienza la intervención con biolarvicida, justo antes del pico histórico quinquenal de la semana 20. A partir de allí

Fig. 2. Cantidad de larvas colectadas en los criaderos centinelas y mosquitos/hora/hombre (MHH) colectados con atrayente humano para *An. darlingi* (A) y *An. nuneztovari* s.l. (B) entre mayo 2010 y mayo 2011. Las flechas marcan las aplicaciones de biolarvicida.

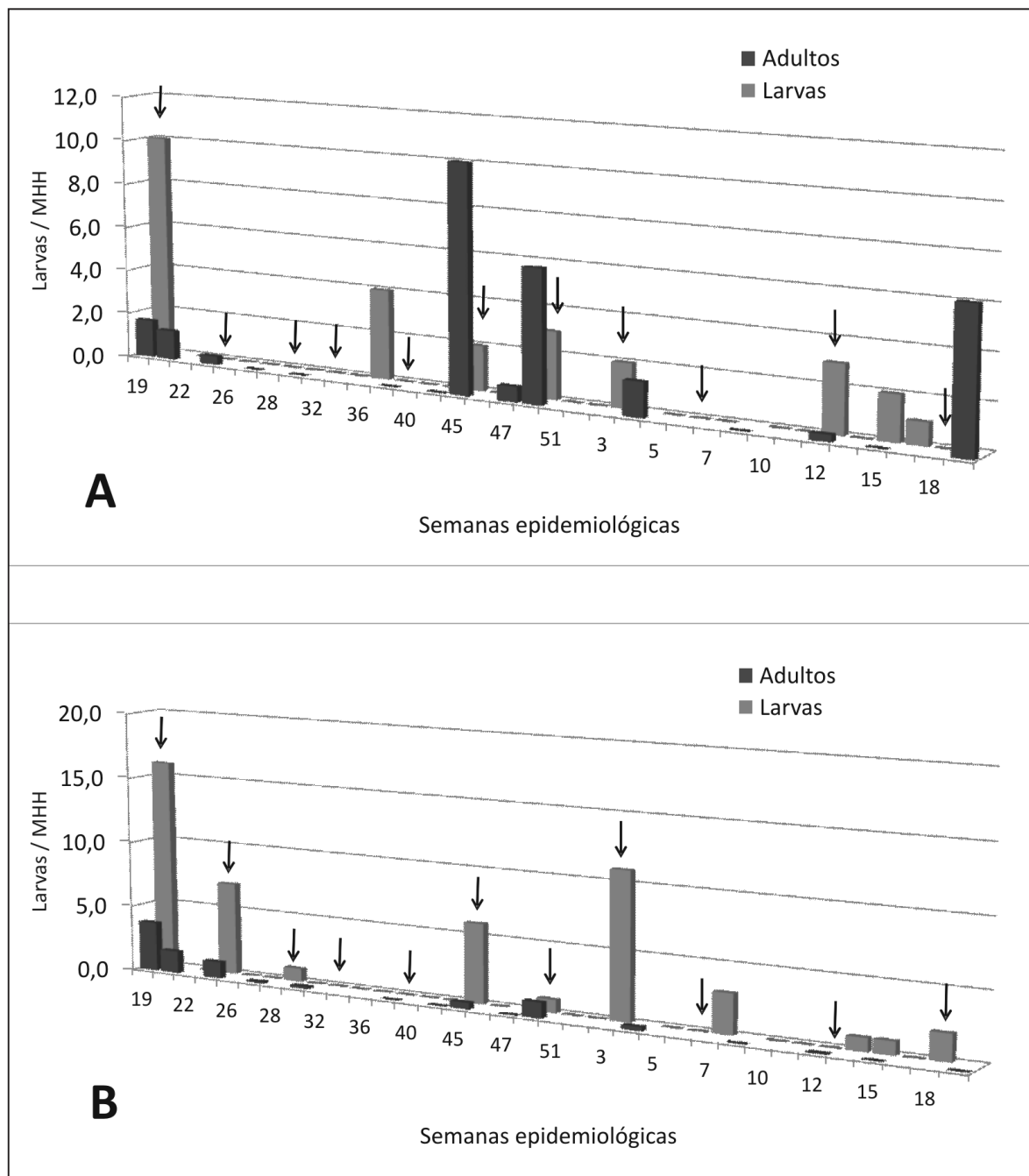
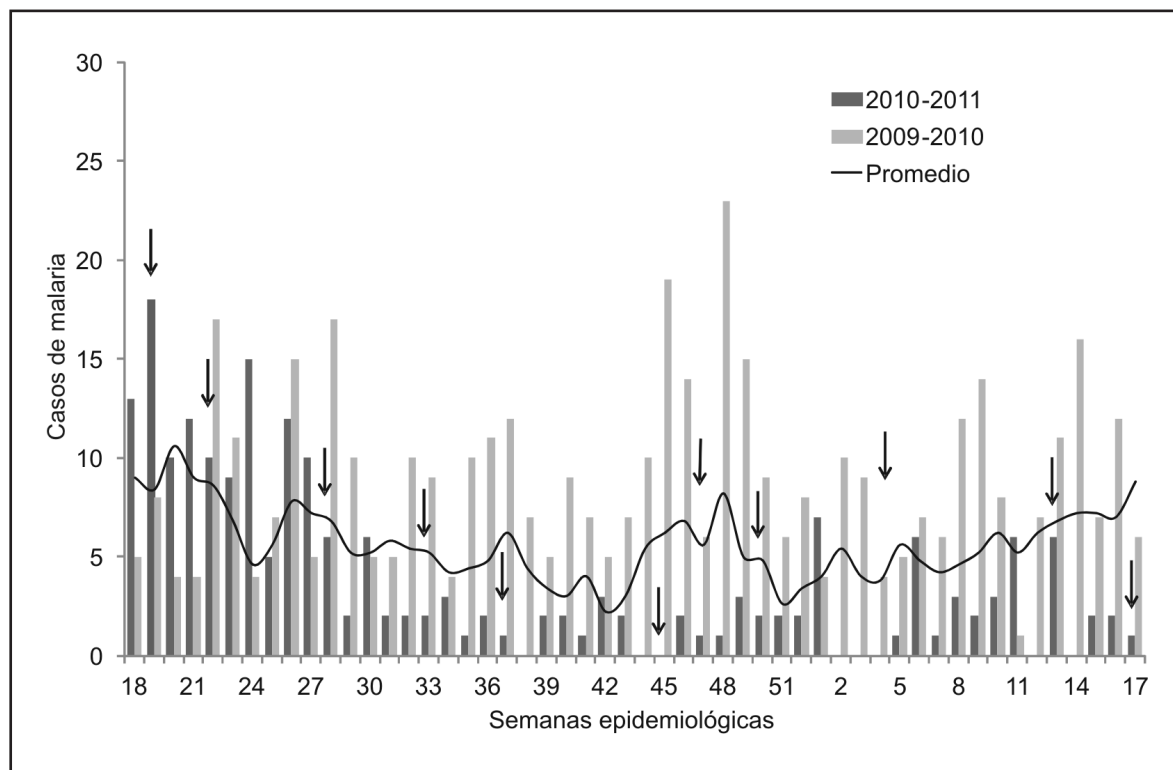


Fig. 3. Casos semanales de malaria en el periodo intervenido de mayo 2010 a mayo 2011 con respecto al periodo homologo anterior y al promedio de cinco periodos anteriores. Las flechas marcan las aplicaciones de biolarvicida.



comienza un declive pronunciado de los casos de malaria, el cual se intensifica a partir de la semana 28, hasta caer por debajo del promedio quinquenal después de la semana 30, manteniéndose así durante el resto del estudio, excepto algunos casos que superaron el promedio ocurridos a comienzos de 2011, los cuales pueden ser debidos a una mala investigación epidemiológica (Fig. 3).

El efecto de la aplicación del biolarvicida sobre los casos de malaria en el área intervenida se aprecia de manera más clara, cuando se comparan los casos del periodo intervenido de 52 semanas, de la semana 18 de 2010 a la semana 17 de 2011, con el periodo homologo anterior 2009-2010 (Fig. 3). En el grafico se evidencia una disminución progresiva de los casos en el período intervenido con respecto al periodo anterior, debido a las aplicaciones sucesivas de biolarvicida. En términos porcentuales, para el periodo intervenido, hubo una reducción de 40% después de la primera aplicación de biolarvicida, 60% en la tercera, alcanzándose 80% con respecto al

valor inicial en la cuarta aplicación, manteniéndose así durante el resto del estudio.

DISCUSIÓN

Formulaciones comerciales del biolarvicida *B. sphaericus* han sido utilizadas con éxito para el control de malaria en muchas oportunidades, sin embargo son pocas las experiencia de evaluación siguiendo protocolos estándar. Esto es debido en gran parte a las dificultades inherentes al establecimiento de criterios de evaluación confiables en condiciones de campo no experimentales, en áreas endémicas a malaria. Entre los obstáculos más resaltantes se pueden mencionar las dificultades para establecer controles y obtener indicadores entomológicos y epidemiológicos confiables.

Con relación al primer caso, si bien el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2005), indica el establecimiento de criaderos controles para estudios de campo fase III, como base

para el análisis posterior de la eficacia del producto en los criaderos, no es conveniente establecer controles cuando se aplica una medida en áreas con transmisión activa de malaria, porque se estaría exponiendo a la población y porque se estaría comprometiendo la eficiencia misma de la aplicación al dejar criaderos sin tratar. Por estas razones este es un estudio no controlado, por lo cual la fiabilidad de los indicadores entomológicos en lo concernientes a las larvas se ve afectada.

Con respecto a los indicadores entomológicos, hay dos componentes que evaluar, los cuales no necesariamente están correlacionados, la densidad de larvas y de mosquitos adultos. En el caso de las larvas, la fiabilidad de este indicador está suficientemente demostrada cuando se hace bajo condiciones controladas; no obstante, en ausencia de control, un esquema de evaluación previa a la aplicación puede suplir esta carencia, tal como el utilizado por Kroeger *et al.* (1995) cuando evaluaron Bti para controlar malaria en Perú y Ecuador, o también un diseño de área control, como el utilizado en Brasil por Galardo *et al.* (2013). En este estudio no se utilizó ninguno de los dos diseños anteriores, sin embargo, se verificó una disminución importante de la abundancia de larvas en los criaderos de aproximadamente 60% luego de la primera aplicación y así sucesivamente, confirmando la actividad del producto aplicado y su eficacia para mantener las poblaciones de larvas bajo control en condiciones naturales, aspecto que ya había sido previamente evaluado con excelentes resultados (Moreno *et al.*, 2010). Resultados similares obtuvieron Fillinger & Lindsay (2006) en Kenia & Galardo *et al.* (2013) en Brasil, quienes lograron reducir la densidad larval en 95 y 80% respectivamente luego de aplicar VectoLex® en los criaderos. No obstante, independientemente del diseño que se utilice, la eficacia de la aplicación va a depender de la que la cobertura sea suficiente, todo el criadero y todos los criaderos, que la frecuencia sea regular según la persistencia del producto estimada previamente, y que la dosis aplicada sea adecuada.

De manera análoga, la utilización de la abundancia de mosquitos adultos como indicador de eficacia, es una práctica poco frecuente, quizá debido a las dificultades en los métodos de colecta y a los costos que representan la colecta de mosquitos por tiempo prolongado. Por otro lado, su utilidad como elemento de comparación es limitada, debido a la falta de correspondencia con la abundancia de larvas, tal

como se demuestra en este trabajo. Al respecto, los resultados de este trabajo difieren de los realizados con Bti en Perú y Ecuador y VectoLex® en Kenia y Brasil, los cuales reportan reducciones importantes en la tasa de picada de los mosquitos luego de la aplicación del biolarvicida y una fuerte correlación en la reducción de su abundancia con la de las de larvas (Kroeger *et al.*, 1995; Fillinger & Lindsay, 2006; Galardo *et al.*, 2013). En este estudio, no se pudo evidenciar correspondencia entre la abundancia de larvas y adultos, debido a que los datos no son lo suficientemente sólidos para llegar a tal conclusión, ya que el esfuerzo de muestreo entre ambas series no es temporalmente comparable. Más aun, al observar el comportamiento de la serie de abundancia de adultos sola, para ambas especies, la serie no evidencia una disminución en la prevalencia de adultos. Por el contrario, a la mitad y al final del estudio hay un incremento considerable en la abundancia de *An. darlingi*, lo cual podría ser debido a razones biológicas, tales como el flujo de mosquitos de criaderos desconocidos no tratados, o a razones de muestreo que hacen que ambas series no sean comparables. No obstante, la utilidad de este indicador radica en el hecho de que si la aplicación del biolarvicida en los criaderos es eficaz, entonces se esperaría una disminución significativa en la densidad de adultos y consecuentemente en la transmisión de malaria, tal como ha sido demostrado por Kroeger *et al.* (1995), Fillinger & Lindsay (2006) y Galardo *et al.* (2013).

Si bien en este estudio la abundancia de mosquitos adultos no resultó ser un buen indicador de la eficacia del producto, los datos de malaria confirman sin lugar a dudas la eficiencia del biolarvicida para reducir la morbilidad por esta enfermedad en el área tratada. La figura de las series de malaria evidencia como la epidemia se reduce notoriamente, desde el momento en que comienza la aplicación y cae a niveles insignificantes hacia el final del estudio, con respecto al periodo previo a la aplicación. Este resultado es contundente en demostrar la eficiencia del producto para controlar malaria y evidencia la importancia de los casos de malaria, junto con la abundancia de larvas, como indicadores por excelencia en este tipo de estudio.

Más allá de la fiabilidad o pertinencia de los indicadores entomológicos utilizados, la importancia de este estudio radica en que, a diferencia de otros similares, se demuestra claramente la efectividad del producto evaluado para controlar malaria, cuando la

aplicación se hace adecuadamente cumpliendo los preceptos de cobertura, frecuencia y dosificación mencionados previamente. La mayoría de las evaluaciones operativas de biolarvicida, se limitan a demostrar la eficacia de estos productos para reducir la prevalencia de larvas y mosquitos sobre la población, mas no demuestran su efecto sobre la morbilidad por malaria (Kroeger *et al.*, 1995; Barbazan *et al.*, 1998; Fillinger & Lindsay, 2006; Galardo *et al.*, 2013). Es la primera vez que se evalúa este producto biológico en Venezuela con un enfoque operativo, siendo los resultados muy promisorios, al demostrarse que su aplicación es factible dentro de un programa integral de control de esta enfermedad, junto con otras medidas tales como el uso de mosquiteros tratados con insecticida y rociamiento intradomiciliario.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no hubo conflicto de intereses con persona o institución alguna en ninguna de las etapas de ejecución de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar por el suministro del biolarvicida para las aplicaciones así como por el apoyo logístico recibido a lo largo del proyecto. Asimismo, a las comunidades del área de estudio por la receptividad mostrada durante la ejecución del trabajo. Este Proyecto fue financiado por FONACIT mediante el convenio N° 2002000410

REFERENCIAS

- Aché A. A. (1998). Situación actual de la malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* 38:68-72.
- Barbazan P., Baldet J., Darriet F., *et al.* (1998). Impact of treatment with *Bacillus sphaericus* on *Anopheles* populations and transmission of malaria in Maroua, a large city in a savannah region of Cameroon. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 14: 33-39.
- Dirección Nacional de Salud Ambiental (2010). *Boletín Integral de Salud Ambiental* (Semana epidemiológica N° 52). Maracay, Venezuela.
- Faran M. E. & Linthicum K. J. (1981). A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 13: 1-81.
- Fillinger U. & Lindsay S. W. (2006). Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Trop. Med. Int. Health.* 11: 1-14.
- Galardo A. K. R., Zimmerman R. & Galardo C. D. (2013). Larval control of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* using granular formulation of *Bacillus sphaericus* in abandoned gold-miner excavation pools in the Brazilian Amazon Rainforest. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46: 172-177.
- Grillet M-E., Martínez J. E. & Barrera R. (2009). Focos calientes de transmisión de malaria: Implicaciones para un control orientado y efectivo en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* 49: 7-22.
- Karch S., Asidi N., Manzambi Z. M. & Salaum J. J. (1992). Efficacy of *Bacillus sphaericus* against the malaria vector *Anopheles gambiae* and other mosquitoes in swamps and rice fields in Zaire. *J. Mosq. Control Assoc.* 8: 376-380.
- Kroeger A., Horstick O., Riedl L., *et al.* (1995). The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropica.* 60: 47-57.
- Kumar A., Sharma V. P., Sumodan P. K., Thavaselam D. & Kamat R. H. (1994). Malaria control utilizing *Bacillus sphaericus* against *Anopheles stephensi* in Panaji, Goa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10: 534-539.
- 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. E., Rubio-Palis Y., Paez 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., 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 (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotrópica.* **19**: 55-58.
- 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.
- Rivera L., Sherman C., Ortiz M. & Tabora C. (1998). Operational experience of use of two formulations of *Bacillus sphaericus* (Strain 2632) in different types of breeding sites of *Anopheles albimanus* and *Culex quinquefasciatus* in Honduras. 64th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association. Sparks, USA.
- Rivera M. (1998). Larvicidal impact of two formulations of *Bacillus sphaericus* (Strain 2362): *VectoLex*[®] CG, *Spherimus liquid* on *Anopheles albimanus* larvae in natural habitats in Nicaragua in 1996. 64th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association. Sparks, USA.
- Rubio-Palis Y., Bevilacqua M, Medina Da, et al. (2013). Malaria entomological risk factors in relation to land cover in the Lower Caura River Basin, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **108**: 220-228.
- Rubio-Palis Y. (2000). *Anopheles (Nyssorhynchus) de Venezuela taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Publicado por la Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldon" y el Proyecto Control de Enfermedades Endémicas.* Maracay, Venezuela.
- Sharma S. N., Sharma T. & Prasad H. (1998). Impact of Spherix (*Bacillus sphaericus* B-101, serotype H5a, 5b) spraying on the control of mosquito breeding in rural areas of Farrukhabad District, Uttar Pradesh. *Indian J. Malariol.* **35**: 185-196.
- Suarez M. F. (1999). Impact of *Bacillus sphaericus* (VectoLex[®]) in the control of *Anopheles albimanus* & *Culex* spp. In Buenaventura, Colombia. 65th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association. St. Louis, USA.
- WHO (2005). Draft. Guideline for laboratory y field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. Geneva, Switzerland.
- Zimmerman R. H. & Berti J. (1994). The importance of integrated control of malaria for the preservation of wetlands in Latin America, pp. 797-803. In W. J. Mitch (ed.), *Global Wetlands: Old World and New.* Elsevier, Amsterdam, North Holland.

Recibido el 08/10/2013
Aceptado el 29/04/2014