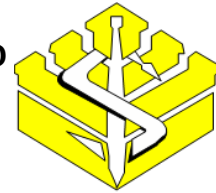




UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
"PROFA. OMAIRA FIGUEROA"
SEDE ARAGUA



EFECTO INSECTICIDA DEL *Bacillus sphaericus* CONTRA *Anopheles spp.* DEL MUNICIPIO MARIO BRICEÑO IRAGORRY, 2023

**Trabajo de Investigación presentado como
requisito para aprobar la Asignatura por:**

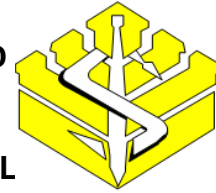
Kenya Sotillo

Eduardo Tain

Maracay, Noviembre 2023



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
"PROFA. OMAIRA FIGUEROA"
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



EFECTO INSECTICIDA DEL *Bacillus sphaericus* CONTRA *Anopheles spp.* DEL MUNICIPIO MARIO BRICEÑO IRAGORRY, 2023

Trabajo de Investigación presentado como requisito para aprobar la Asignatura por:

Br. Kenya Sotillo

Br. Eduardo Tain

Tutora Científica: Profa. Luisa Elena Figueroa

Tutor Metodológico: Prof. José Romero

Maracay, Noviembre 2023



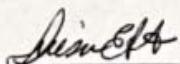
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS SEDE ARAGUA
PROFESORA "OMAIRA FIGUEROA"
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



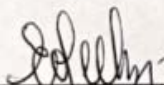
VEREDICTO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Trabajo de Investigación titulado: **"Efecto insecticida del *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles* spp. del municipio Mario Briceño Irigorry, 2023"** presentado por los bachilleres Kenya Sotillo y Eduardo Tain con el fin de aprobar la Asignatura Trabajo de Investigación; después de la exposición y discusión pública del citado trabajo, consideramos que el mismo reúne los requisitos para **APROBARLO** como tal. En fe de lo cual se levanta la presente acta, el día martes catorce del mes de noviembre del año dos mil veintitrés, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actuó como Coordinador del jurado, el Tutor Metodológico Profesor José Romero.

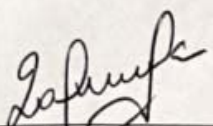
Por otra parte, se hace constar, para efectos académicos de convalidación, que el presente trabajo representa el equivalente al Trabajo de Grado reconocido en otras instituciones y el contenido del veredicto es auténtico.



Prof. Luisa Figueroa
C.I.: 13 492 002
Tutora Científica



Dr. Aguilés Montagne
C.I.: 9.903.717
Jurado Evaluador



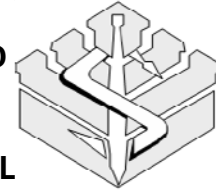
Prof. José Romero
C.I.: 9527241
Coordinador del Jurado



TI039-JR-2023



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



Maracay, 14 de noviembre de 2023

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL TUTOR CIENTÍFICO

En mi carácter de Tutor Científico del Trabajo titulado Efecto insecticida del *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles spp.* del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023, el cual es presentado por los Bachilleres Kenya Sotillo y Eduardo Tain, para aprobar la asignatura Trabajo de Investigación, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado designado.

Prof. Luisa Figueroa

C.I.: 13.492.802

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a Dios por permitirnos culminarlo con éxito a pesar de las adversidades, a nuestros padres y seres queridos por ser pieza fundamental de nuestro crecimiento y brindarnos su apoyo incondicional y al Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” (SAIAE), por brindarnos motivación, materiales y conocimiento para llevar a cabo la investigación, sobre todo a la profesora Luisa Figueroa por su paciencia y dedicación. Y por último a Hirohiko Araki, porque 37 años de creatividad no deben pasar desapercibidos.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por permitirnos llegar hasta este punto y colocarnos siempre en el camino correcto.

A nuestros familiares y amigos por apoyarnos en cada etapa y brindarnos su comprensión cuando lo necesitamos.

A los profesores que han prestado su apoyo a la universidad compartiéndonos su conocimiento y parte de su experiencia.

Al personal del CEESA que nos ha abierto sus puertas, brindándonos respeto y amabilidad y permitiéndonos realizar nuestro trabajo de investigación dentro de sus instalaciones.

ÍNDICE GENERAL

	PP
VEREDICTO	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Tipo de investigación	7
Población y muestra	7
Técnicas e instrumentos de recolección de datos	8
Procedimiento experimental.....	8
Análisis de datos.....	15
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

LISTA DE TABLAS

N°	PP
1. Porcentaje de mortalidad de <i>Bacillus sphaericus</i> contra larvas de segundo instar de <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023. Bioensayo N°1.....	16
2. Porcentaje de mortalidad de <i>Bacillus sphaericus</i> contra larvas de tercer instar de <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023. Bioensayo N°2.....	17
3. Porcentaje de mortalidad de <i>Bacillus sphaericus</i> contra larvas de tercer instar de <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023. Bioensayo N°3.....	17
4. Prueba Estadística de la mortalidad de <i>Bacillus sphaericus</i> contra larvas de segundo y tercer instar de <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023	17

LISTA DE FIGURAS

N°	PP
1. Ubicación geográfica de localidades muestreadas para la captura de <i>An. (Nyssorhynchus) strodei</i> en el Municipio Mario Briceño Iragorry en el año 2023.....	11
2. Adulto hembra de <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i>	12
3. Niveles de Esterasas Alfa en <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> en el municipio Mario Briceño Iragorry, 2023	18
4. Niveles de Esterasas Beta en <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> en el municipio Mario Briceño Iragorry, 2023	18
5. Niveles de Oxidasas en <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> en el municipio Mario Briceño Iragorry, 2023	19

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA

EFFECTO INSECTICIDA DEL *Bacillus sphaericus* CONTRA *Anopheles*
spp. DEL MUNICIPIO MARIO BRICEÑO IRAGORRY, 2023

Bachilleres:

Br. Kenya Sotillo

Br. Eduardo Tain

Tutora Científica: Profa. Luisa Elena Figueroa

Tutor Metodológico: Prof. José Romero

Maracay, Noviembre 2023

RESUMEN

Los anofelinos son el género de vectores transmisores de la malaria a nivel mundial. Debido a la importancia para la salud pública que constituye el estudio de control de vectores para malaria, se presenta un trabajo de investigación acerca del control biológico de estos insectos con el propósito de evaluar la efectividad del producto granulado de *Bacillus sphaericus* (Neide, 1904) Vectolex (WDG) contra larvas de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* (Root, 1926) del Municipio Mario Briceño Iragorry, Estado Aragua. Los mosquitos fueron capturados y trasladados al laboratorio entomológico del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” (SAIAE) para ser alimentados hasta su oviposición y obtener larvas. Estas larvas fueron criadas hasta los estadios de 2do y 3er instar para la realización de bioensayos con diferentes concentraciones de *B. sphaericus*. Las concentraciones empleadas fueron 0,0078; 0,006; 0,002; 29; 30; 40; 50; 67; 100; 500; 1000; 2000 y 5000 ppm. La concentración letal 50 obtenida para larvas de 2do y 3er instar de *An. (Nyssorhynchus) strodei* fue de 0,92 ppm y la 95 de 3,73 ppm. Esto sugirió que esta especie es susceptible al efecto bioinsecticida del *B. sphaericus*, y que de los mecanismos de resistencia bioquímica estudiados (actividad de esterasas alfa, beta y oxidasas) no existe una producción significativa.

Palabras clave: *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*, *Bacillus sphaericus*, Malaria, Bioinsecticida, Resistencia bioquímica.

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA

**INSECTICIDE EFFECT OF *Bacillus sphaericus* AGAINST *Anopheles spp.*
FROM THE MARIO BRICEÑO IRAGORRY MUNICIPALITY, 2023**

ABSTRACT

Anophelines are vectors for malaria on a global scale. Because of how important for public health the study of malaria vector control is, a work of research is presented concerning the biological control of these insects. The purpose of which was to evaluate the effectiveness of the granulated product *Bacillus sphaericus* (Neide, 1904) Vectolex (WDG) against *Anopheles spp.* larvae from the Mario Briceño Iragorry municipality, Aragua State. After collecting mosquitoes from the area, they were identified as *Anopheles (Nyssorhynchus) strode* (Root, 1926). These mosquitoes were taken to the entomological laboratory of the Center of Endemic Diseases Studies and Environmental Health (CEEESA, in spanish), which is part of the Autonomous Service High Studies Institute “Dr. Arnaldo Gabaldón” (SAIAE, in spanish) and were fed until oviposition. The larvae reached 2nd and 3rd instar and were exposed to different concentrations of *B. sphaericus*. The concentrations used were 0.0078; 0.006; 0.002; 29; 30; 40; 50; 67; 100; 500; 1000; 2000 y 5000 ppm, resulting in a lethal concentration 50 of 0.92 ppm and a lethal concentration 95 of 3.73 ppm. This indicates that *An. (Nyssorhynchus) strodei* is susceptible to the bioinsecticide effect of *B. sphaericus*. The biochemical resistance mechanisms studied (esterase alpha, beta and oxidase activity) in the larvae exposed to *B. sphaericus* did not indicate the presence of significant resistance.

Keywords: *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*, *Bacillus sphaericus*, Malaria, Bioinsecticide, Biochemical resistance

INTRODUCCIÓN

La malaria, también llamada paludismo, es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*. Se transmite a los humanos, su hospedador intermediario, a través de la picadura de mosquitos del género *Anopheles*, hospedadores definitivos. Los pacientes presentan síndrome febril agudo o crónico, anemia, esplenomegalia y hepatomegalia (Wide *et al.*, 2011).

Haciendo referencia a su etiología, se considera que *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890) y *P. falciparum* (Welch, 1897) son las causas más frecuentes de paludismo, seguidas por *P. malariae* (Felleti & Grassi, 1889) y *P. ovale* (Stephens, 1922) (OPS, 2022).

Sobre el ciclo de reproducción del parásito, este comienza cuando el mosquito hembra infectado pica al hombre, inoculándole en la sangre el estado esporozoíto del parásito *Plasmodium*. Los esporozoítos llegan al hígado. En las células hepáticas, los esporozoítos se desarrollan y multiplican transformándose en el estado esquizonte que, tras su rotura, libera miles de merozoítos. Los merozoítos liberados en el torrente sanguíneo penetran en el interior de los eritrocitos donde maduran y se dividen, dando lugar a un número variable de merozoítos, que salen al torrente sanguíneo e invaden nuevos eritrocitos (en esta fase se produce la manifestación de la enfermedad en humanos). Después de cumplir este ciclo dentro de los eritrocitos 2 o 3 veces, algunos merozoítos inician un proceso de gamogonia, transformándose en gametocitos masculinos y femeninos. Cuando el vector pica a un humano infectado ingiere los eritrocitos con los gametocitos. En el estómago del insecto los gametocitos quedan libres y se forman gametos masculinos y femeninos. Tras producirse la fecundación, el cigoto penetra en el intestino estomacal y se transforma en un trofozoito. Después de esto, estos migran a

las glándulas salivales del mosquito, de forma que el mosquito infectado al picar a un nuevo humano, comienza de nuevo el ciclo (Zaragozano, 2001).

Sobre la epidemiología de la malaria se puede mencionar que es endémica en regiones tropicales y subtropicales del mundo y causa más de 300 millones de episodios y al menos un millón de muertes al año. El 90% de estas muertes ocurren en África subsahariana, principalmente en niños pequeños (Vargas, 2003).

De esta manera, África es el continente con la mayor cantidad de casos en el mundo con 228 millones, siendo el 95% de los casos mundiales. Los casos de malaria en las Américas en el 2021 comprenden el 0,3% de los casos mundiales. El 77% de los casos en las Américas se reportaron en Brasil, Colombia y Venezuela. Venezuela lidera en América Latina en casos de malaria. En 2019 hubo 467.000 casos en el país (OMS, 2021).

De hecho, en el reporte de Fundación IO, (2023), se expone que en Venezuela, en la entidad de Delta Amacuro, desde la semana 1 hasta la semana 17 se han reportado un total de 390 casos de malaria por *P. vivax*, 36 casos de malaria por *P. falciparum* y 17 casos de malaria mixta. Las cifras suponen un aumento considerable si se compara con los datos registrados durante el mismo periodo en 2022, cuando se documentaron 34 casos de malaria por *P. vivax*, 9 de malaria por *P. falciparum* y 3 de malaria mixta.

Asimismo, en el estado Aragua, durante el periodo de 1996 y 2005, se diagnosticaron 706 casos de malaria, de los cuales el 87,53% era debido a *P. vivax*, 10,91% a *P. falciparum*, 1,42% a infecciones mixtas y 0,14% a *P. malariae* (Cáceres *et al.*, 2007).

Haciendo referencia al vector responsable de la transmisión de la malaria, han sido descritas alrededor de 475 especies de mosquitos *Anopheles*, 70 de ellas son vectores potenciales de malaria (Alvarado, 2019).

De 42 especies de anofelinos encontrados en Venezuela, 11 están involucradas con la transmisión de malaria (Rubio-Palis *et al.*, 2013).

Específicamente, la especie *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* se encuentra distribuida en todo el continente latinoamericano, en países como Venezuela, Argentina, Bolivia, Costa Rica, Honduras, México y Brasil (Walter Reed Biosystematics Unit, 2021).

Sin embargo, *An. (Nyssorhynchus) strodei* no es comúnmente identificado como vector malárico, pero debería ser considerado como tal, ya que se ha infectado de manera experimental con *P. vivax* y se han reportado especies infectadas naturalmente en Brasil (Rubio-Palis, 2000).

Sobre las condiciones de vida y la actividad de *An. (Nyssorhynchus) strodei*, se ha reportado que en Venezuela es más abundante durante la época de lluvia, habiendo picos entre los meses de julio y septiembre. Además, su pico de actividad ocurre durante las 24:00 y las 01:00 horas. (*Op. cit*)

Sobre el uso de insecticidas residuales en Venezuela, Oletta, J., (2018) plantea que el número de personas protegidas contra la malaria gracias al rociamiento intradomiciliario de insecticidas residuales disminuyó de una cobertura del 26% de la población de riesgo en el 2015, a 1% en el 2016 y a menos del 1% en el 2017.

El aumento en números de casos de malaria en Venezuela sugiere un sistema ineficaz de control de vectores, ya que el mosquito tiene suficiente tiempo para transmitir el parásito (Cáceres, 2013).

Es por ello que surgen métodos alternativos al control químico de vectores, como es el caso del *Bacillus thuringiensis* *svar. israelensis* (Berliner, 1915) y ahora el desarrollo de *Bacillus sphaericus*.

En consecuencia a esto, se han utilizado bioinsecticidas como el *B. sphaericus* (bacilo Gram-positivo) para el control de estos vectores. El bacilo entra en las larvas y produce las toxinas binarias A y B, siendo efectivo contra poblaciones de *Anopheles spp.*, *Aedes spp.* y *Culex spp.* Estas toxinas son liberadas y se solubilizan por el pH alcalino en la porción media del intestino, activan las proteasas causando deshidratación y muerte a los vectores (Gómez *et al.*, 2009).

A saber, el producto Vectolex WDG está compuesto por *B. sphaericus* serotipo H5a5b, cepa 2362 de forma deshidratada concentrada en un 51,2%, y entra en la categoría III (Valent BioSciences, s.f.).

La ventaja de utilizar productos biológicos como el *B. sphaericus* radica en que son inocuos para la fauna acuática asociada al hábitat (Berti *et al.*, 2010).

Siguiendo esta idea, Berti *et al.*, (2012) en un estudio realizado en manglares del municipio Mariño, estado Sucre, en el que expusieron al vector *An. aquasalis* (Curry, 1932) ante el producto Vectolex WDG, encontraron resultados prometedores, en los cuales la dosis de 2,0 Kg/ha mantuvo un porcentaje de mortalidad de 85,12% hasta por 8 días de la aplicación, y la dosis de 2,5 Kg/ha mantuvo un porcentaje de mortalidad de 92,2% hasta por 16 días después de la aplicación.

Asimismo, Moreno *et al.* (2014) aplicaron el biolarvicida en criaderos de *An. nuneztovari* (Gabaldón, 1940) en una zona endémica del estado Bolívar, y se observó, luego de 48 semanas de exposición, una reducción del 80% de la malaria en la zona y una reducción en la densidad de larvas en los criaderos.

Por lo tanto un buen control sobre las poblaciones de vectores de malaria podría bajar los números de casos en el país, ya que presenta un problema grave de salud pública.

Sobre la efectividad del *B. sphaericus* sobre larvas de *An. nuneztovari* Rojas *et al.* (2001) determinaron que, para este vector, la CL50 se encontraba en 0,07 ppm y la CL95 en 0,69 ppm, obteniendo una mortalidad del 100% a las 72 horas de observación.

Por otro lado, Oliveira *et al.* (2009) estudiaron el comportamiento celular de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *An. albitarsis* (Lynch-Arribáizaga, 1878) y *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) al ser expuestos al *B. sphaericus*. Observaron hipertrofia en las células del epitelio intestinal de los vectores y, posteriormente a esto, se formaron vesículas en la porción apical que se desprendían de forma similar a una secreción apocrina. Esta reacción puede ser indicio de un posible mecanismo de defensa ante el biolarvicida, ya que esta secreción apocrina es más intensa en los vectores más resistentes.

Asimismo, Silva-Filha *et al.* (2021) analizaron la actividad de la toxina binaria del *B. sphaericus*. Determinaron que la resistencia a la toxina binaria del *B. sphaericus* se debía por ausencia o alteración del receptor para la toxina por parte de los vectores.

En definitiva, se debe tener en cuenta el daño que un insecticida a utilizar pueda causar en especies que no son el blanco a atacar, así como sus efectos en el ambiente. Se vuelve fundamental realizar estudios de bioinsecticidas, como lo es el *B. sphaericus*, que pueden mantener su espectro limitado a los vectores problema, así como retardar la aparición de los alelos de resistencia que puedan desarrollar por el uso de otros tipos de insecticidas, para tener un control de futuros brotes de malaria.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto insecticida del *Bacillus sphaericus* sobre *Anopheles spp.* del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023.

Objetivos específicos

Determinar dosis diagnóstica de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles spp.* del municipio Mario Briceño Iragorry.

Identificar mecanismos bioquímicos de resistencia a insecticidas en *Anopheles spp.* del municipio Mario Briceño Iragorry.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación

Se trató de una investigación de tipo experimental, ya que se propició un escenario con manipulación de variables y se evaluó la disminución o permanencia de la población observada. De carácter exploratorio, porque puede dar pie a futuras investigaciones sobre efecto larvicida del *Bacillus sphaericus*; positivista con carácter cuantitativo, puesto que se emplearon datos numéricos obtenidos como fundamentos para probar las hipótesis. De tipo transversal, dado que el experimento y la recolección de datos se llevaron a cabo en un momento determinado.

Población y muestra

La población de estudio consistió en la población de anofelinos de la urbanización “El Paseo” del municipio Mario Briceño Iragorry.

La muestra consistió en la elección de adultos de *An. (Nyssorhynchus) strodei*, que fueron trasladados al laboratorio entomológico del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” (SAIAE), Maracay, estado Aragua.

La muestra estuvo compuesta por 20 larvas de 2do instar y 60 larvas de 3er instar seleccionadas al azar de *An. (Nyssorhynchus) strodei*.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se recolectaron los datos a través de la observación de los cambios ocurridos en las larvas de *An. (Nyssorhynchus) strodei*. Los resultados fueron registrados diariamente en base a la muerte o no de las larvas.

Procedimiento experimental

1.1 Cría de larvas de *An. (Nyssorhynchus) strodei* de forma directa y mantenimiento de la colonia.

La recolección de los mosquitos hembra se realizó empleando cebo humano en la parte más boscosa, montañosa y oscura de la urbanización “El Paseo” en el municipio Mario Briceño Iragorry (Figura 1). Se llevó a cabo entre las 17:00 y las 19:00 horas.

Se realizaron cuatro capturas en las que se colectaron 2 ejemplares adultos en la primera; 2 ejemplares adultos en la segunda; 1 ejemplar adulto en la tercera y 0 ejemplares adultos en la cuarta.

Para atraer a los vectores, el área baja de las piernas tuvo que ser descubierta. Este género tiene afinidad por la zona de las pantorrillas.

El material empleado para la captura del vector fue un objeto de vidrio en forma de tubo con boquilla, que emplea una goma de látex y una malla intermedia a mitad del canal. Una vez que el vector buscó alimentarse, el extremo contrario a la boquilla se colocó en la pierna del especialista cubriendo completamente al mosquito para succionarlo hasta la malla localizada en la mitad.

El extremo del tubo fue introducido inmediatamente en el hoyo lateral de un vaso de cartón parafinado y una vez que el mosquito ingresó al interior

del vaso, el orificio fue sellado nuevamente con cinta adhesiva para impedir su escape.

Los vasos de cartón parafinados de 14cm de largo x 8cm de ancho empleados para la captura, fueron cubiertos con tela de tul y una liga.

Una vez capturado el vector, el vaso se colocó en el interior de una cava con una servilleta húmeda y se cerró (Rubio Palis, 2015).

Los ejemplares adultos fueron trasladados al laboratorio entomológico del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” (SAIAE), Maracay, estado Aragua, para dar inicio a la cría de los mosquitos.

La fuente de alimento de los vectores fue una paloma doméstica.

Como contenedores se emplearon vasos plásticos pequeños de 3.5x3.0cm en los cuales se introdujo algodón humedecido hasta formar una capa de aproximadamente 1 cm. El interior del vaso fue cubierto con servilleta para trasladar los huevos a un recipiente más grande una vez que la hembra los hubiese depositado.

Se mantuvieron en el insectario del laboratorio a una temperatura de 27 grados centígrados +/- 2 con luz natural y una humedad relativa de $80,5 \pm 7.5\%$ (Zerpa, N. 1998).

El material empleado para evitar la salida del mosquito del contenedor, fue malla de tul y una liga.

La mayoría de los mosquitos de este género mueren durante la cría por no encontrarse exactamente en las condiciones para su mantenimiento, sin embargo, lograron sobrevivir.

Una vez que los vectores depositaron huevos (4 días después de haber sido alimentados), las servilletas fueron retiradas y colocadas en un recipiente de plástico de aproximadamente 30 cm de largo por 20 cm de ancho y 5 cm de profundidad en el que se colocó agua de pecera hasta alcanzar un grosor de aproximadamente 1 cm. Entre el día 2 y el día 3 nacieron 80 larvas.

Posterior a esto, cuando se produjo la eclosión de las larvas se trasladaron a otra cubeta más grande con un nivel de agua de 1 cm. Las larvas alcanzaron el estadio deseado para la realización de los bioensayos (2er instar) en el día 5 después de haber nacido.

En la primera captura se atraparon 2 mosquitos del género y especie *An. (Nyssorhynchus) strodei*; en una segunda se colectaron 2 mosquitos más del mismo género y especie; en la tercera captura se atrapó un solo mosquito y en la cuarta no se consiguió ninguno.

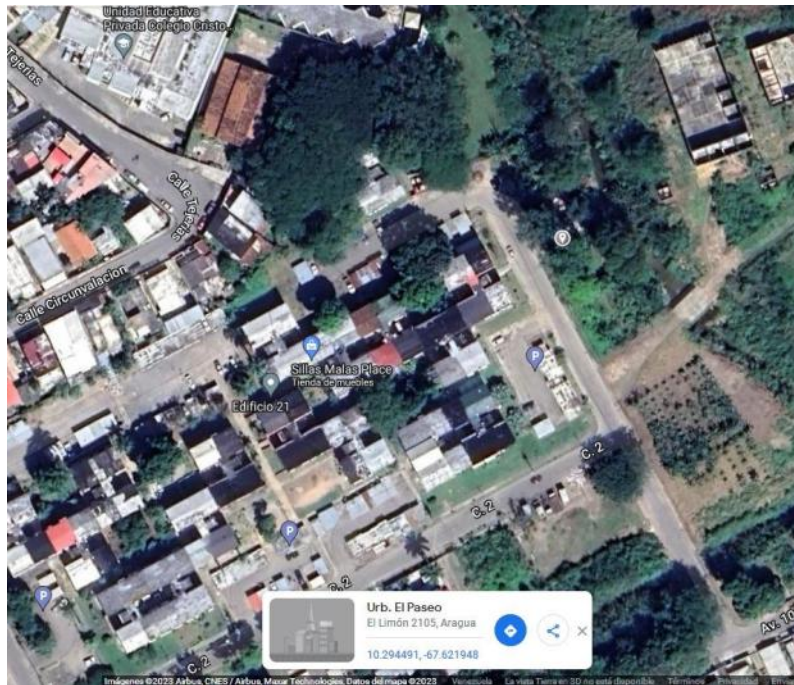


Figura 1. Ubicación geográfica de localidades muestreadas para la captura de *An. (Nyssorhynchus) strodei* en el Municipio Mario Briceño Iragorry en el año 2023. (Julio, 2023)

1.2 Identificación de hembras adultas de *An. (Nyssorhynchus) strodei* capturados

Se utilizó la clave taxonómica descrita por Rubio-Palis (2000) para la identificación de hembras adultas de *An. (Nyssorhynchus) strodei*:

- a) Tarsómero posterior 5 (Ta-III₅) con anillo basal oscuro;
- b) Penachos de escamas caudolaterales presentes en los tergos abdominales II-VII;
- c) Longitud de la banda basal oscura del tarsómero posterior 2 (Ta-III₂) 0,24-0,35 de la longitud del tarsómero;
- d) Longitud de la mancha subcosta clara (SCC) de la costa menos de 0,50 veces la longitud de la mancha sectorial oscura distal (SOD);

- e) Longitud de la mancha humeral clara (HC) de la costa más de 2,5 veces la longitud de la mancha prehumeral oscura (PHO);
- f) Vena humeral transversa (h) nunca toca el ápice de la mancha prehumeral oscura (PHO);
- g) Escamas claras del ala completamente blancas.



Figura 2. Adulto hembra de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*

1.3 Preparación con Vectolex WDG

Para el primer bioensayo se prepararon concentraciones de 0,0078 ppm; 0,0060 ppm; y 0,0020 ppm, que se obtuvieron utilizando 0,78; 0,60 y 0,20 microgramos de producto VECTOLEX respectivamente con 100 ml de agua.

Las soluciones se prepararon en balones aforados de 100 ml y se colocaron posteriormente en vasos plásticos nuevos de 120 ml rotulados. Se trabajó en un orden de mayor a menor más el control.

En el segundo ensayo se preparó una solución madre con 5 gramos de producto VECTOLEX y agua de pecera para proporcionar un ambiente puro. Se enrasó a 100 ml.

La concentración de la solución madre fue de 50.000 ppm y las diluciones preparadas fueron 1/10; 1/25; 1/50; 1/100 y 1/500. Por lo tanto, las concentraciones utilizadas en el segundo ensayo fueron de 5.000 ppm, 2.000 ppm; 1.000 ppm; 500 ppm y 100 ppm respectivamente.

Para el tercer bioensayo se trabajó con diluciones mayores: 1/750; 1/1000; 1/1250; 1/1500 y 1/1750, obteniendo concentraciones de 65 ppm; 50 ppm; 40 ppm; 30 ppm y 29 ppm respectivamente.

1.4 Determinación de la efectividad del *B. sphaericus* en larvas de segundo y tercer instar de *An. (Nyssorhynchus) strodei*

Para el primer bioensayo se capturaron, con una pipeta Pasteur, las larvas de 2do instar de *An. (Nyssorhynchus) strodei* presentes en el recipiente de plástico donde crecieron y se alimentaron los días anteriores. Se colocaron 5 larvas en la solución de 0,0078 ppm; 5 en la solución de 0,0060 ppm; 5 en la de 0,0020 ppm y 5 en el control. Se trabajó con un total de 20 larvas en el primer bioensayo.

Para el segundo bioensayo se colocaron 5 larvas de 3er instar en cada uno de los vasos con las nuevas concentraciones (5.000 ppm, 2.000 ppm; 1.000 ppm; 500 ppm y 100 ppm) y el control. Se trabajó con un total de 30 larvas.

Para el tercer y último bioensayo se emplearon un total de 30 larvas de 3er instar, colocando 5 por cada concentración (65 ppm; 50 ppm; 40 ppm; 30 ppm y 29 ppm) y empleándose 5 para el control (Cárdenas 2012).

1.5 Identificación del mecanismo de resistencia de las larvas contra *B. sphaericus*

Las larvas sobrevivientes a la exposición al *B. sphaericus* en los bioensayos fueron seleccionadas para determinar los mecanismos de resistencia in vitro.

A través del método bioquímico se detectó el tipo de actividad enzimática presente, que se llevó a cabo por microtitulación.

El mecanismo de resistencia metabólica principal se debe al incremento de la actividad de las esterasas y en menor medida a la actividad de las oxidasas (Molina *et al.*, 2016).

Se maceraron las larvas de forma individual en recipiente para microcentrifugación en 50 μ L de solución amortiguadora de fosfato de sodio a 0,05 M y pH de 7,5.

Se centrifugaron las mezclas a 14.000 RPM por 5 minutos, tomando cada larva como un individuo y agregando el sobrenadante de cada una en un pocillo diferente de la placa de microtitulación.

Para la determinación de esterasas alfa y beta se añadieron 50 μ L de alfa-naftil acetato y beta-naftil acetato, respectivamente, a cada 50 μ L del homogenato utilizando una placa de transferencia de boquilla 96. Se incubó la preparación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente se agregaron 50 μ L de Dianisidina a cada pocillo de prueba, dejando incubar la placa por 2 minutos para después realizar la lectura con el lector de ELISA, utilizando un filtro de 630 nm.

Para la determinación de oxidasas se preparó el reactivo 3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina (TMBZ) pesando 6,3 mg de TMBZ, agregando 3,13 mL de metanol y 9,4 mL de solución amortiguadora de buffer de acetato a 0,25 M

y pH 5. Se añadieron 30 μ L de solución de peróxido de hidrógeno a cada pocillo de la placa.

Análisis de datos

Los resultados de mortalidad fueron sometidos a análisis estadísticos de regresión y correlación lineal probit, con el que se determinaron las concentraciones letales 50 y 95 (CL50 y CL95) (Raymond, 1985; Delgado, 2005).

Los resultados obtenidos de la identificación de mecanismos de resistencia enzimáticos fueron sometidos a una base de datos y se graficó la distribución de frecuencias de absorbancias para estos mecanismos con el programa Excel.

RESULTADOS

Se realizaron tres bioensayos para evaluar el efecto bioinsecticida de *B. sphaericus* contra *An. (Nyssorhynchus) strodei*. Como se observa en la Tabla 1, con menores concentraciones de la formulación Vectolex se obtiene un porcentaje de mortalidad inferior al 50%.

Asimismo, en la Tabla 2 se observa que una concentración de 500 ppm es la concentración mínima con la que se obtiene un porcentaje de mortalidad del 100% a las 24 horas. Asimismo, en la Tabla 3 se puede ver que con concentraciones menores a 100 ppm el porcentaje de mortalidad se reduce en un 27%.

Con respecto a las concentraciones letales 50 y 95 (CL50 y CL95) para larvas de *An. (Nyssorhynchus) strodei*, se obtuvieron resultados de 0,92 ppm y 3,72 ppm, respectivamente (Tabla 4).

Finalmente, la frecuencia de valores de esterasas alfa para larvas de *An. (Nyssorhynchus) strodei* oscilaba entre 0,2 y 0,7 (Figura 2); para esterasas beta, entre 0,1 y 0,4 (Figura 3); y para oxidasas, entre 0,2 y 0,3 (Figura 4).

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de segundo instar de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023. Bioensayo N°1

Concentraciones	% de Mortalidad
1. 0,0078 ppm	40%
2. 0,0060 ppm	20%
3. 0,0020 ppm	0%

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de tercer instar de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023. Bioensayo N°2

Concentraciones	% de Mortalidad
1. 5000 ppm	100%
2. 2000 ppm	100%
3. 1000 ppm	100%
4. 500 ppm	100%
5. 100 ppm	86%

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de tercer instar de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023. Bioensayo N°3

Concentraciones	% de Mortalidad
1. 67 ppm	83%
2. 50 ppm	83%
3. 40 ppm	83%
4. 30 ppm	83%
5. 29 ppm	83%

Tabla 4. Prueba Estadística de la mortalidad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de segundo y tercer instar de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* del municipio Mario Briceño Iragorry, 2023

CL50 (ppm)	CL95 (ppm)	χ^2	χ^2 (p=0,05; G.L.=12)
0,92	3,72	50.497,74	21,026

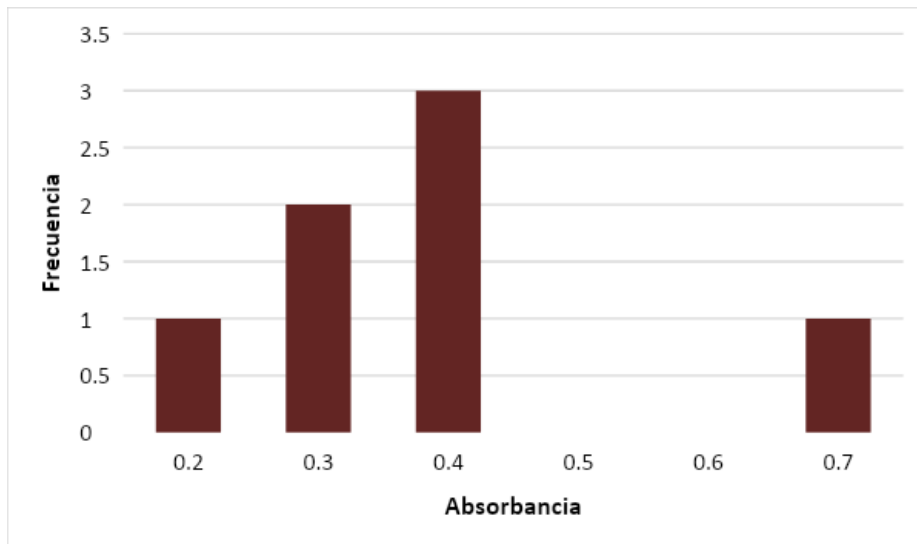


Figura 3. Niveles de Esterasas Alfa en *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* en el municipio Mario Briceño Iragorry, 2023

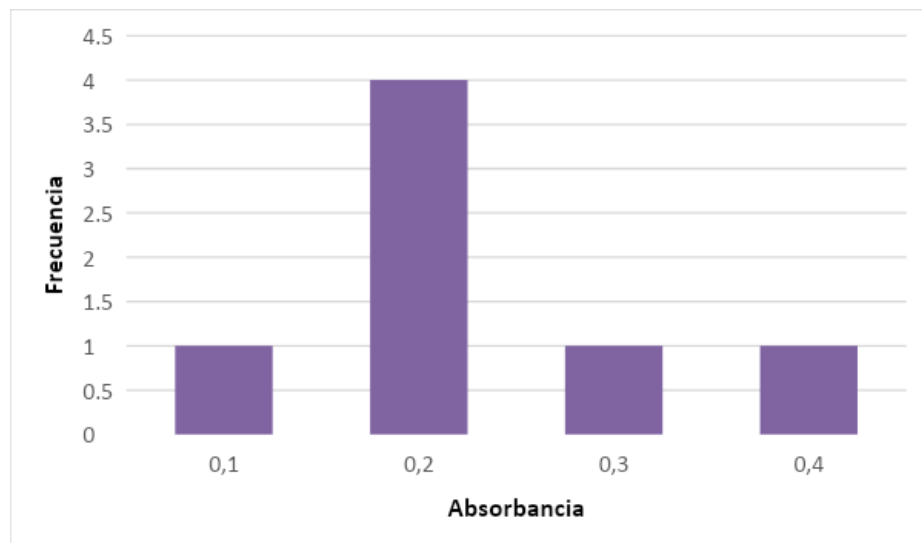


Figura 4. Niveles de Esterasas Beta en *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* en el municipio Mario Briceño Iragorry, 2023

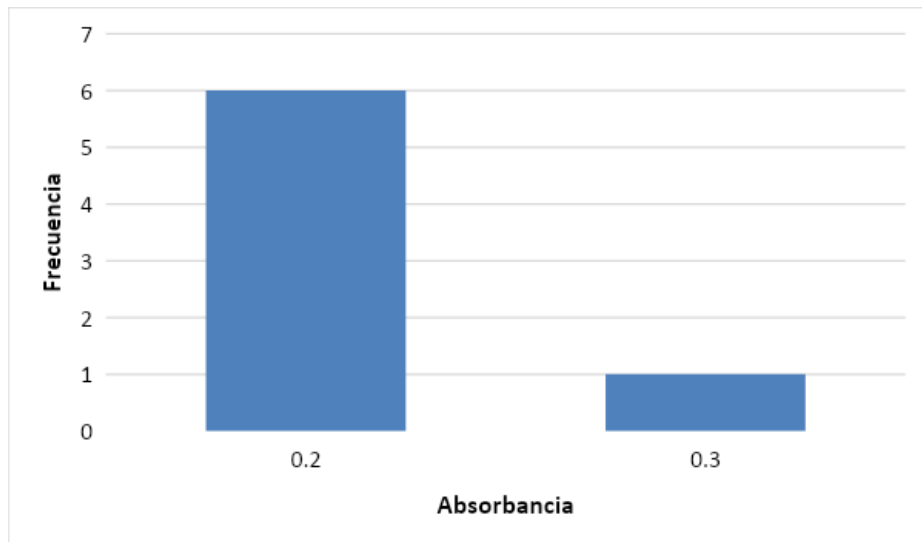


Figura 5. Niveles de Oxidasas en *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* en el municipio Mario Briceño Iragorry, 2023

DISCUSIÓN

De acuerdo al estudio realizado, se puede determinar que el producto Vectolex WDG, en concentraciones bajas, representa una alternativa al control de vectores, tal como lo demostró Cárdenas *et al.*, (2012) en el estudio en que se probaron concentraciones entre 5 y 200 ppm del producto granulado *B. sphaericus* contra larvas de *Cx. quinquefasciatus* y *An. albimanus* (Wiedemann, 1820), observándose que todas las larvas de *Cx. quinquefasciatus* habían muerto a las 24 horas y todas las larvas de *An. albimanus* permanecían vivas. Por esta razón, fue necesario ajustar las concentraciones diez veces menores para *Cx. quinquefasciatus* y subir las concentraciones para *An. albimanus*.

En base a esto, puede señalarse que *An. (Nyssorhynchus) strodei* es susceptible al *B. sphaericus*, ya que en bajas concentraciones (29 ppm) se obtuvo 83% de mortalidad a las 24 horas.

De la misma forma, Berti *et al.*, (2002) observaron el 100 % de reducción en la densidad relativa de larvas de *An. aquasalis* con 2 y 3 g/m² del producto (Vectolex® CG 7.5%) de *B. sphaericus* en forma granulada a las 96 horas. Esto indica que *B. sphaericus* presenta un buen porcentaje de efectividad contra especies del género *Anopheles*.

En cuanto a las concentraciones letales, Cárdenas *et al.* (2012) evaluaron la efectividad de *B. sphaericus* ante larvas de *An. albimanus* colectadas en la colonia Barranquilla y la colonia Cartagena, y de *Cx. quinquefasciatus* colectadas de la colonia Sibaté y la colonia Villavicenci. Determinaron que la CL50 de las especies de *An. albimanus* de las colonias Barranquilla y Cartagena fue de 176,6 ppm y 192,73 ppm respectivamente. Mientras que las especies de *Cx. quinquefasciatus* de las colonias Sibaté y

Villavicenci obtuvieron un CL50 de 2 ppm y 2,2 ppm, respectivamente. Observaron que *An. albimanus* es menos susceptible al insecticida que *Cx. quinquefasciatus*.

De esta forma se puede determinar que *An. (Nyssorhynchus) strodei* de la F1 proveniente de las colonias del municipio Mario Briceño Iragorry resultó susceptible a bajas concentraciones del insecticida, obteniéndose una CL50 de 0,92 ppm.

Con respecto a la resistencia metabólica, Molina et al. (2009) determinaron que en adultos de *An. aquasalis* del municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela, se observaba un incremento en la resistencia metabólica a insecticidas organofosforados. Las frecuencias de los valores de esterasas alfa y beta, para estos ensayos, oscilaban entre 0,8 y 3,7, y de oxidasas entre 0,1 y 2,3.

En contraste, la frecuencia de valores de esterasas alfa, beta y oxidasas para larvas de *An. (Nyssorhynchus) strodei* se encontraron por debajo de estos resultados, pudiendo interpretarse que el vector no presenta resistencia metabólica.

CONCLUSIONES

1. Se determinó que *An. (Nyssorhynchus) strodei* es susceptible al efecto bioinsecticida del *B. sphaericus*.

2. Por medio de análisis estadístico de regresión lineal, se obtuvieron los valores de CL50 y de CL95, para *B. sphaericus* contra *An. (Nyssorhynchus) strodei*, los cuales fueron de 0,92 ppm y 3,72 ppm, respectivamente.

3. No se observó resistencia bioquímica en *An. (Nyssorhynchus) strodei* a través del análisis de frecuencia de absorbancias de la actividad de esterasas alfa, beta y de oxidasas.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar mayor número de capturas de mosquitos, para continuar la búsqueda de especies del género *Anopheles* en el municipio Mario Briceño Iragorry y determinar su susceptibilidad al *B. sphaericus*.

2. Ya que el estudio realizado fue llevado a cabo con larvas F1 criadas en el laboratorio de *An. (Nyssorhynchus) strodei*, se recomienda estudiar los géneros larvarios que habitan en los pantanos formados durante la época de lluvia en los principales focos de malaria del país (estados Bolívar, Amazonas, Sucre y Anzoátegui) y en caso de encontrar especies de anofelinos, probar la efectividad del producto Vectolex (WDG) - 51,2% para observar el porcentaje de reducción larval.

3. Es recomendable aumentar la inversión en estudios con métodos de biocontrol como *B. sphaericus* o *B. thuringiensis svar israelensis* en los principales focos de malaria en el país, para contrarrestar el aumento de casos que se vienen presentando por diseminación, preservando la integridad del ecosistema y población general.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, L. (2019). *Infección de Anopheles spp por Plasmodium spp y su importancia en la transmisión de malaria en comunidades indígenas del Amazonas colombiano* (tesis de maestría). Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
- Berti Moser J, Ramírez X, González J., 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*. Centro de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental. Laboratorio Entomológico de Malaria, Las Delicias, Aragua, Venezuela.
- Berti, J., González, J., Navarro-Bueno, E., Zoppi, E., Gordon, E., & Delgado, L. (2010). Estacionalidad de la densidad larval del mosquito *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) y otros insectos asociados a su hábitat en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58(2), 777-787. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000200019&lng=en&tlng=es.
- Berti, J., Herrera, M., González, J., Puentes, N., Caraballo, R., & Valero, J. (2012). Pruebas de campo sobre la eficacia y persistencia de tres formulaciones de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry en manglares del municipio Mariño, estado Sucre, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 52(1), 67-77. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482012000100006&lng=es&tlng=es.
- Cáceres J., Mendoza, F., Peña, F. & Serrano, O., (2007). Malaria inducida en el estado Aragua, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 47(1). Recuperado de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482007000100005

Cáceres J. (2013). Récord de incidencia malárica en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53(1), 88-98. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1690-46482013000100013&lng=es&nrm=iso

Cárdenas, E., Rozo, Á., & Lugo, L. (2012). Mortalidad en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* (díptera: culicidae), causada con un producto de *Bacillus sphaericus* (bacteria: *bacillaceae*) en presentación granulada en condiciones experimentales. *Revista de Medicina Veterinaria*, (23), 23-32. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542012000100003&lng=en&tlng=es.

Delgado, N. 2005. Evaluación de la eficacia de un insecticida biológico mediante análisis PROBIT. Instituto de zoología agrícola, Universidad Central de Venezuela.

Fundación IO. (2023). Malaria en Venezuela, Delta Amacuro. Recuperado de <https://fundacionio.com/malaria-en-venezuela-delta-amacuro/#:~:text=Los%20casos%20de%20malaria%20en,17%20casos%20de%20malaria%20mixta>.

Gómez, E., Hernández, C., y Corrales, L. (2009). *Bacillus sphaericus*: biocontrolador de vectores que producen malaria, fiebre amarilla y dengue. *Nova*, 7(12), 161–167. doi: 10.22490/24629448.433

Google (s.f.) [Urb. El Paseo]. Recuperado de <https://maps.app.goo.gl/azpGEZZb2yYwevcF7>

Molina, D., & Figueroa, L. (2009). Resistencia metabólica a insecticidas organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. *Biomédica*, 29(4), 604-615. Recuperado de

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572009000400014

Molina, D., Bastidas, D., Molina, N., Figueroa, L., Guerra, A., González, J.,...Ramírez, R. (2016). Estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela a insecticidas químicos. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 56(1), 30-42. Recuperado de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482016000100004

Moreno, J., Martínez, A., Acevedo, P., Sánchez, V., Amaya, W., Petterson L.,..Ascanio, Y. (2014). Evaluación preliminar de la eficiencia de *Bacillus sphaericus* en un área endémica a malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 54(1), 47-57. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1690-46482014000100006&script=sci_abstract

Oletta, J., (2018). Análisis del Reporte Mundial de malaria 2018, y la grave epidemia de malaria en Venezuela. Estimaciones para 2018. Recuperado de <https://icaso.org/wp-content/uploads/2018/11/Ana%C4%9Bllisis-del-reporte-mundial-de-malaria-2018-y-la-grave-epidemia-de-malaria-en-Venezuela.pdf>

Oliveira, C., Tadei, W., y Abdalla, F. (2009). Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitalarsis* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* Neide? *Neotropical Entomology*, 38(5), 624–631. doi: 10.1590/s1519-566x2009000500010

Organización Mundial de la Salud. (2021). *Informe mundial sobre la malaria 2021, datos regionales y tendencias*. Recuperado de https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2021-global-briefing-kit-spa.pdf?sfvrsn=8e5e915_23&download=true

Organización Panamericana de la Salud. (2022). *Organización Panamericana de la Salud*. Washington, EEUU.: Organización Panamericana de la Salud. Recuperado de <https://www.paho.org/es/temas/paludismo>

Raymond, M. (1985). Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 23(2), 117-121. Recuperado de https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/cahiers/entomo/28403.pdf

Rojas, J., Mazzarri, M., Sojo, M., y García-A, G. (2001). Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 sobre larvas de *Anopheles nuñeztovari*. Mérida, Venezuela. *Investigación Clínica*, 42(2), 131-146. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332001000200005&script=sci_abstract&tlng=es

Rubio-Palis, Y. (2000). *Anopheles (Nyssorrhynchus) de Venezuela, taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica*. Maracay. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldón" y el proyecto control de enfermedades endémicas.

Rubio-Palis, Y., Ruiz-Lopez, F., Guzmán, H., Sánchez, V., Moreno, J., Estrada, Y.,...Martínez, A. (2013). Primer registro de *Anopheles (Nyssorrhynchus) oswaldoi* B y *Anopheles (Nys.) albitarsis* F en la cuenca del río Caura, Estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53(1), 68-72. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1690-46482013000100009&lng=pt&nrm=iso&tlng=es

Rubio-Palis, Y. (2015). Manual de métodos para capturar anofelinos y otros mosquitos (Diptera: Culicidae). Servicio autónomo Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldon.

Silva-Filha, M., Romão, T., Rezende, T., Carvalho, K., Gouveia, H., do Nascimento, N.,...Bravo, A. (2021). Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance. *Toxins*, 13(8), 523–559. doi: 10.3390/toxins13080523

Valent BioSciences, (s.f.). *Vectolex WDG* [Contacto Caja de etiqueta]. Illinois.

Vargas, J. (2003). Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*, 11(1), Recuperado de https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/epidemiologia/v11_n1/pdf/a05.pdf

Walter Reed Biosystematics Unit (2021). *Anopheles strodei* species page. *Walter Reed Biosystematics Unit*, Recuperado de <http://wrbu.si.edu/mosquitoes/vectorspecies/strodei>

Wide, A., Moreno, J., y Noya, O. (2011). *Fundamentos en el Diagnóstico y Control de la Malaria*. Recuperado de <http://www.iaes.edu.ve/index.php/centro-de-descargas/finish/3-libros-y-publicaciones/3673-2011--fundamentos-en-el-diagnostico-y-control-de-la-malaria>

Zaragozano, J. (2001). Paludismo: un grave problema de salud mundial. *Medicina Integral*, 38(4), 167-174. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-paludismo-un-grave-problema-salud-13018801>

Zerpa, N., Moreno, J., González, J. y Noya, O. (1998). Colonization and laboratory maintenance of *Anopheles albimanus* Wiedemann in Venezuela. *Revista Institution Medicina tropical Sao Paulo*, 40(3): 173-176.