

Ensayo de campo con Bactivec® (*Bacillus thuringiensis*) y Griselesf® (*Bacillus sphaericus*) en sitios de cría de *Anopheles* sp. en Luanda, Angola

Field assay with Bactivec® (*Bacillus thuringiensis*) and Griselesf® (*Bacillus sphaericus*) in breeding sites of *Anopheles* sp. from Luanda, Angola

Duniarliz Lamothe Nuviola,¹ Yoenys Hidalgo Flores,¹ María del Carmen Marquetti Fernández¹¹

¹ Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas (LABIOFAM). La Habana, Cuba.

¹¹ Instituto Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el control de los vectores de malaria en Angola es principalmente mediante de la lucha antilarval usando Bactivec® (*Bacillus thuringiensis*) y Griselesf® (*Bacillus sphaericus*).

Objetivo: evaluar la efectividad y residualidad del uso de los biolarvicidas sobre las poblaciones larvales de *Anopheles* sp. en Angola.

Métodos: todos los sitios de cría seleccionados en el municipio de Luanda se trataron con *B. thuringiensis* y *B. sphaericus*, y se monitorearon a los 7, 15, 21 y 30 días postratamiento en busca de presencia de larvas de mosquitos. Las aplicaciones se repitieron mensualmente durante 5 meses (agosto-diciembre, 2014).

Resultados: el porcentaje de sitios de cría con larvas 21 días después de la aplicación varió entre el 39,2 % y el 43 % durante los meses que duró la investigación, con un incremento entre el 50,4 % y el 78,1 % a los 30 días. La efectividad de los tratamientos a las 24 y 48 h después de la aplicación osciló entre el 98 % y el 100 %. *Anopheles* sp. se encontró en 136 sitios de cría en todos los meses monitoreados, clasificados en 13 tipos diferentes, principalmente en casas y patios inundados y zanjas de desagües. La residualidad en los sitios de cría como promedio fue de 20,2 días.

Conclusiones: se demuestra la efectividad de los biolarvicidas en la reducción de las poblaciones larvales de *Anopheles* sp., por lo que combinarlos con los métodos convencionales adulticidas como el uso de mosquiteros impregnados y la pulverización intradomiciliar residual, potenciaría un mayor impacto en la reducción de la malaria en Angola.

Palabras clave: biolarvicidas; *Anopheles* sp.; efectividad; residualidad; Angola.

ABSTRACT

Introduction: control of malaria vectors in Angola is mainly based on antilarval combat with Bactivec® (*Bacillus thuringiensis*) and Griselesf® (*Bacillus sphaericus*).

Objective: evaluate the effectiveness and residuality of the use of biolarvicides against larval populations of *Anopheles* sp. in Angola.

Methods: all the breeding sites selected in the municipality of Luanda were treated with *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* and checked for mosquito larvae 7, 15, 21 and 30 days after treatment. Applications were repeated monthly for five months (August to December 2014).

Results: the percentage of breeding sites with larvae 21 days after application ranged between 39.2 % and 43 % during the study period, with an increase of 50.4 % to 78.1 % at 30 days. Effectiveness of the treatment 24 and 48 hours after application ranged between 98 % and 100 %. *Anopheles* sp. were found in 136 breeding sites throughout the study period, mainly in flooded houses and backyards and drainage ditches, and were classified into 13 different types. Residuality in breeding sites averaged 20.2 days.

Conclusions: it was demonstrated that biolarvicides are effective to reduce larval populations of *Anopheles* sp. It is therefore recommended to combine them with conventional adulticidal methods such as the use of impregnated mosquito nets and residual home spraying to obtain better results in the struggle to reduce malaria in Angola.

Keywords: biolarvicides; *Anopheles* sp.; effectiveness; residuality; Angola.

INTRODUCCIÓN

Según las últimas estimaciones, en 2013 se produjeron 198 millones de casos de malaria en el mundo (con un margen de incertidumbre que osciló entre 124 millones y 283 millones) que ocasionaron la muerte de unas 584 000 personas (con un margen de incertidumbre que osciló entre 367 000 y 755 000). La tasa de mortalidad por malaria se redujo en más de un 47 % desde el año 2000 a nivel mundial, y en un 54 % en la región de África. La mayoría de las muertes se produjeron entre niños que viven en África, aunque la tasa de mortalidad por malaria se redujo desde 2000 en un porcentaje estimado del 58 %.¹

En el mundo hay alrededor de 20 especies diferentes de mosquitos *Anopheles* que tienen importancia local en la transmisión de malaria.² Estos crían en aguas paradas de poca profundidad (charcos, campos de arroz, huellas de animales, etc).³⁻⁵ La transmisión es más intensa en lugares donde los vectores tienen una vida relativamente larga que permite que el parásito tenga tiempo para completar su desarrollo en el interior del mosquito, y cuando el vector prefiere picar al ser humano antes que a otros animales.¹ Estas características están presentes en las especies que actúan como vectores en África siendo la causa de que más del 90 % de las muertes por malaria se registren en este continente.¹

La malaria es endémica en Angola, con una alta transmisión en las provincias del norte, moderada transmisión en las provincias del centro y una baja transmisión con ocurrencia de epidemias en las provincias del sur del país. *Anopheles gambiae*, Giles 1902 y *Anopheles funestus*, Giles 1900 son los principales vectores de la malaria en Angola, pero también se reportan otras especies como *Anopheles arabiensis*, Patton 1905, *Anopheles nili*, Theobald 1904, *Anopheles pharoensis*, Theobald 1901 y *Anopheles melas*, Theobald 1903 (datos del Plan Estratégico de la Malaria en Angola 2016-2020).

El control de los vectores de malaria en Angola es principalmente mediante la lucha antilarval usando biolarvicidas Bactivec® (*Bacillus thuringiensis var israeliensis* serotipo H-14) y Griselesf® (*Bacillus sphaericus* cepa 2362) que es aplicado a nivel de municipios por brigadas nacionales bajo la supervisión de la cooperación cubana brindada por el Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas (LABIOFAM). Este método de control está presente en las 18 provincias del país y está vigente desde el 2009 hasta los momentos actuales. Existen otros métodos contra el mosquito adulto, como la pulverización intradomiciliar residual usando insecticidas piretroides limitada a provincias en el sur del país y desde el 2006 se ha incrementado la distribución de mosquiteros impregnados con insecticidas, aunque la cobertura todavía en el país es insuficiente (datos del Plan Estratégico de la Malaria en Angola 2016-2020).

El objetivo de este trabajo fue evaluar en un ensayo de campo la efectividad y residualidad del uso de los biolarvicidas en los diferentes tipos de sitios de cría utilizados por los vectores de malaria en Luanda, Angola.

MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

La provincia de Luanda, capital de Angola, posee una extensión de 113 km² y está situada en las coordenadas 8° 50'00"S y 13° 14'00"E, tiene una población de 6 542 944 habitantes, distribuidos la gran mayoría en barrios urbanos densamente poblados (datos del Censo Nacional realizado del 5 al 31 de mayo del 2014; Instituto Nacional de Estadísticas de Angola). La provincia se divide en 7 municipios: Belas, Cacuaco, Cazenga, Icolo de Bengo, Quissama, Viana y Luanda. El área de estudio correspondió al municipio Luanda que tiene el mismo nombre que la provincia y que está compuesto por los distritos de Ingombota, Maianga, Samba, Sambizanga, Rangel y Kilamba Kiaxi. Hay que destacar que es un municipio con una gran urbanización en desarrollo y que tres de sus distritos son costeros. Angola presenta dos estaciones climáticas en el año: la estación de seca que comienza en junio hasta septiembre y la estación lluviosa que comienza en octubre hasta mayo. Luanda pertenece al estrato epidemiológico de malaria estable (datos del Plan Estratégico de la Malaria en Angola 2016-2020).

MUESTREO ENTOMOLÓGICO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se escogieron 329 sitios de cría repartidos en los seis distritos (Ingombota 71, Rangel 47, Samba 55, Sambizanga 62, Kilamba Kiaxi 55 y Maianga 39). La selección de los mismos se realizó mediante un muestreo longitudinal que se caracteriza por la medición en periodos temporales sucesivos de variables, en este caso la presencia o no de larvas en los sitios escogidos⁶ en cada uno de los distritos; lo que implicó a que el esfuerzo de muestreo fuera elevado. La clasificación de las larvas solo se llevó hasta nivel de género empleando claves morfológicas.⁷ Las pupas no se tuvieron en cuenta durante el estudio.

El muestreo fue realizado por el equipo del Programa Nacional de Malaria de Angola, entrenados en actividades de lucha antivectorial e identificación de las larvas de culícidos y supervisados por especialistas cubanos. En cada sitio de cría en todos los muestreos se escogieron entre 1 y 5 puntos de colecta, según la dimensión del sitio de cría, utilizando el método y procedimiento descrito para esta actividad⁸ por medio de un cucharón de color blanco de 350 mL de capacidad el cual se sumergió cinco veces en cada punto,⁹ solamente para detectar presencia o no de larvas de *Anopheles* sp. debido al gran número de sitios de cría implicados en el experimento.

CLASIFICACIÓN DE SITIOS DE CRÍA Y APLICACIÓN DE BIOLARVICIDAS

Los biolarvicidas fueron aplicados en todos los sitios con presencia de larvas de mosquitos. Estos sitios se agruparon en cuatro grupos: primer grupo, los relacionados con el desagüe de las aguas de la ciudad que incluyó zanjas con un ancho que varió entre 1 y 10 m de ancho y de gran longitud, y otras con menos de 1 m de ancho (ambas pudieron ser o no cementadas), las fosas o esgotos y los registros o cajas de agua; segundo grupo, los naturales que incluyeron lagunas, charcos en tierra, remanso de ríos y canales de irrigación para el cultivo; tercer grupo, los de almacenamiento de agua para diversas funciones que incluyeron huecos en tierra para ser utilizados en la construcción de bloques para fabricar viviendas, cacimbas o pozos y las fuentes ornamentales; y el cuarto grupo donde se agruparon los patios y casas inundadas permanentemente, situados en zonas mayoritariamente cerca de las costas donde el agua brota del subsuelo.

En cada sitio de cría se aplicó los biolarvicidas Bactivec® (*B. thuringiensis*) y Griselesf® (*B. sphaericus*) con una frecuencia mensual durante 5 meses (agosto-diciembre, 2014); estos sitios fueron revisados 7, 15, 21 y 30 días postratamiento^{8,9} para detectar presencia o no de larvas de *Anopheles* sp. y determinar la efectividad y residualidad de los biolarvicidas. Los sitios de cría de mosquitos fueron tratados en una proporción de 70 % de Bactivec® para un efecto inmediato y un 30 % de Griselesf® para garantizar una mayor residualidad y empleando la dosis calculada, según el área efectiva del sitio de cría a controlar (Bactivec® 2mL/m²; Griselesf® 5mL/m²) de acuerdo con lo establecido por las normas del programa de control de malaria en Angola. La utilización de la mezcla de ambos biolarvicidas a la vez fue decisión de los directivos del Programa de Malaria de Angola y de la unidad empresarial que comercializa los biolarvicidas (LABIOFAM) para lograr lo explicado anteriormente (acción inmediata y mayor residualidad). La aplicación se realizó con aspersores manuales y en ocasiones con motomochilas de 10 L de capacidad.

RESULTADOS

De los 329 sitios de cría tratados en el momento de la primera aplicación realizada en el mes de agosto 77 (23,4 %) contenían solo larvas de anofelinos; 193 (58,7 %) solo de culicineos y 59 (17,9 %) fueron mixtos (anofelinos más culicineos). Los distritos con mayor presencia de *Anopheles* sp. correspondieron a los distritos costeros de Ingombota, Samba y Sambizanga y los de menores positividades Rangel y Maianga (Fig.).

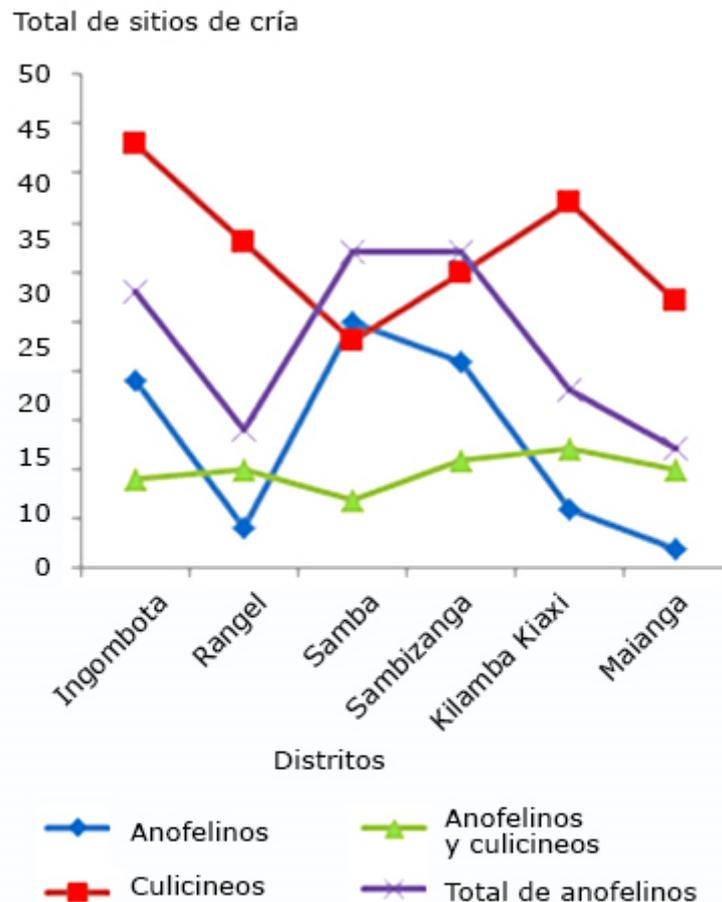


Fig. Comportamiento del total de criaderos con larvas de culicineos y anofelinos por distritos en el municipio, Luanda, Agosto, 2014.

El porcentaje de sitios de cría con presencia de larvas 21 días después de la aplicación varió entre un 39,2 % y un 43 %, durante los meses que duró la investigación; mientras que a los 30 días este se incrementó entre un 50,4 % y un 78,1 % (tabla 1). La efectividad de los tratamiento a las 24 y 48 h después de la aplicación osciló entre un 98-100 % de mortalidad en los sitios de cría tratados.

Anopheles sp. se encontró en un total de 136 sitios de cría clasificados en 13 tipos diferentes (tabla 2), con un predominio en sitios permanentes 109 (80,1 %), como zanjas de desagües y casas y patios inundados; mientras que los semipermanentes representaron 27 (19,9 %). La mayor positividad a *Anopheles* sp. se encontraron en casas y patios inundados con 56 (41,1 %), seguido por el grupo de desagüe de

las aguas de la ciudad 29 (21,5 %); almacenamiento de agua 27 (18,8 %) y los naturales (17,6 %).

Tabla 1. Totales de criaderos tratados con biolarvicidas (n= 329) y positivos a mosquitos, a los 7, 15, 21 y 30 días en el municipio Luanda, Angola, agosto-diciembre, 2014

Meses	Total y % Criaderos 7 días después	Total y % Criaderos 15 días después	Total y % Criaderos 21 días después	Total y % Criaderos 30 días después
Agosto	2 (0,6%)	25 (8%)	132 (40,1%)	166 (50,4%)
Septiembre	2 (0,6%)	45 (13,7%)	135 (41%)	224 (68%)
Octubre	4 (1,2%)	55 (16,7%)	142 (43,2%)	257 (78,1%)
Noviembre	3 (0,9%)	42 (12,8%)	129 (39,2%)	237 (72%)
Diciembre	4 (1,2%)	48 (14,6%)	146 (41,3%)	236 (74,8%)

La residualidad de los biolarvicidas se determinó por el tiempo de aparición nuevamente de larvas de mosquitos en los sitios de cría tratados y no por el comportamiento de la densidad larvaria. Los valores variaron entre los diferentes tipos con un promedio general de 20,2 días ([tabla 2](#)).

Tabla 2. Tipos y totales de sitios de cría positivos a *Anopheles sp.* y promedio de la residualidad de los biolarvicidas en el municipio Luanda, Angola, agosto-diciembre, 2014

Tipos de sitios de cría	Tipo de criadero	Totales	Promedio de residualidad (días)
Zanjas (entre 1 y 10 m de ancho)	Permanente	12	10
Lagunas	Permanente	5	27
Charcos	Semipermanente	15	27
Huecos en tierra	Semipermanente	9	27
Casas inundadas	Permanente	39	25
Zanjas (con o menos de 1 m de ancho)	Permanente	8	20
Patios inundados	Permanente	17	20
Fuentes ornamentales	Permanente	8	20
Fosas o esgotos	Permanente	5	10
Canales de irrigación	Semipermanente	3	10
Pozos o cacimbas	Permanente	10	27
Caja o registro de agua	Permanente	4	21
Remansos de río	Permanente	1	18
Totales		136	20,2

DISCUSIÓN

Los biolarvicidas poseen varias ventajas comparados con otros agentes de control, no solo por su eficacia sino también que son seguros para el ambiente y para el humano e incluso por instancia pueden ser aplicados en agua de beber; todos estos aspectos contribuyeron a que actualmente se consideren una herramienta poderosa para el control de enfermedades transmitidas por mosquitos como la malaria en África y otras partes de los trópicos.¹⁰⁻¹²

Durante el desarrollo del trabajo se identificaron diferentes sitios de cría con presencia de *Anopheles* sp. tanto en sitios permanentes como semipermanentes, ya sean clasificados como naturales o hechos por el hombre (artificiales); este hallazgo es importante en el momento de la ejecución de intervenciones de control pues nos permite plantear que todos constituyen una fuente de riesgo para la proliferación de los vectores de malaria en cualquier época del año; iguales resultados encontraron en Kenya,¹³ donde además destacan que la amplia distribución de *An. gambiae* es favorecida por la gran variedad de tipos de habitats que utiliza para su cría.

Como se plantea al inicio de este trabajo el control de los vectores de malaria en Angola es principalmente mediante la lucha antilarval usando biolarvicidas desde 2009; estos biolarvicidas son aplicados en los sitios de cría de mosquitos identificados en cada municipio. Sin embargo, se carece de información científica de su impacto en las poblaciones de mosquitos anofelinos. Este trabajo mostró que con las dosis utilizadas y combinando *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* menos del 50 % de los sitios de cría tratados eran re colonizados por larvas de mosquitos 21 días postratamiento aumentando hasta un 78,1 % a los 30 días. Existen diversos estudios donde se plantea la baja residualidad (7 días) de *B. thuringiensis*,^{14,15} sin embargo, la residualidad encontrada en este trabajo se debió al uso conjunto de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* en la aplicación, pues es conocido que este último posee una actividad larvicida residual superior al *B. thuringiensis*, debido a que sus esporas persisten por más tiempo y por su habilidad de reciclar en las larvas una vez muertas.¹⁶ Este reciclaje puede contribuir al control de varias generaciones de mosquitos.⁸

Los resultados mostraron que los menores valores de residualidad por tipo de criaderos se correspondieron con las zanjas mayores de 1 m de ancho, fosas, esgotos y canales de irrigación; los tres primeros colonizados en su mayoría por culicineos e incluidos dentro de la clasificación de sitios de drenajes de la ciudad que en ocasiones presentan gran cantidad de desechos sólidos que pueden contribuir a la disminución en los valores de la residualidad de los biolarvicidas en los mismos. Estudios realizados con (Vectobac®) *B. thuringiensis* demostraron que la presencia de materia orgánica influyó en la efectividad y residualidad de los biolarvicidas.¹⁷

Por otra parte, en un estudio realizado en condiciones de laboratorio con *Aedes aegypti* en Cuba se registró que la eficacia de *B. thuringiensis* H-14 disminuyó con la presencia abundante de alimento por efecto de competencia;¹⁸ mientras que en otro estudio de campo realizado en la región central de Cuba, se obtuvo también un menor efecto residual en zanjas donde predominaba un pH alcalino.¹⁹ En el caso de los canales de irrigación, estos presentan en intervalos de tiempo variaciones en la permanencia y volumen de agua que pudieran influir negativamente en la acción de los biolarvicidas.

Cabe señalar que los sitios de cría con menor residualidad son hábitats creados por la acción del hombre ya sea por programas de evacuación de aguas residuales como por programas relacionados con la agricultura urbana, los cuales contribuyen a la presencia y proliferación de los mosquitos en estas áreas,^{20,21} lo que ayuda al incremento de casos de malaria. Esto coincide con los resultados obtenidos sobre el rol que juegan dichos sitios de cría en la transmisión de malaria en Arabia Saudita.²²

Los sitios con mayores valores de residualidad en su mayoría fueron sitios de cría naturales, a excepción de las casas inundadas muy cercanas al litoral costero las cuales se caracterizaron por estar inundadas con agua que brota del subsuelo, aspecto que pudiera influir en la efectividad de los biolarvicidas. Estos predominan en los distritos de mayor presencia de *Anopheles* sp. y se corresponden con una localización costera; ecoregión, que está influenciada básicamente además por la presencia de zonas cenagosas, con aguas claras y vegetación emergentes, y por zonas que tienden a inundarse.²³ Por otra parte, en esta zona se adiciona la presencia de *An. melas*, cuya distribución se extiende a lo largo de la costa Atlántica donde se encuentra Luanda.⁴

En resumen, la efectividad y residualidad de los biolarvicidas en los sitios tratados puede depender de múltiples factores como: grado de polución de las aguas, presencia o no de vegetación, presencia o no de desechos sólidos, movimiento de las aguas, salinidad, pluviometría, densidad larval, heterogeneidad de los sitios de cría, entre otros aspectos^{18,19} cuya influencia no fueron determinados en este estudio pero que merecen futuras investigaciones.

Diferentes factores se encuentran asociados a la transmisión estable de malaria, estrato epidemiológico a la que pertenece Luanda (Plan Estratégico de la Malaria en Angola 2016-2020), los cuales deben de tenerse en cuenta en los programas de control de esta enfermedad; entre estos se destacan: los climáticos, la urbanización y las actividades humanas entre otros.^{24,25}

En cuanto a la urbanización en teoría limita la transmisión de malaria pues se reducen las oportunidades de sitios de cría para el vector,²⁴ sin embargo, en Luanda, el sistema de drenaje de las aguas, garantiza sitios de cría durante todo el año para los anofelinos en particular y para los culícidos en general, como se demostró en este estudio. Además, la urbanización está muy relacionada con las actividades humanas que influyen en la transmisión de malaria destacándose el almacenamiento de agua, en ocasiones para múltiples funciones, conducta de la población en permanecer fuera de las viviendas en horarios de actividad de picada de los mosquitos y las migraciones de personas como las más importantes, todas presentes en las capitales de los países de África incluyendo Angola.^{1, 21,22}

Por otra parte, en nuestro estudio fue imposible obtener los datos de precipitaciones ocurridas en los meses analizados por lo que desconocemos el impacto directo de estas en las poblaciones de culícidos y en las aplicaciones de biolarvicidas realizadas.

En conclusión, independientemente de que la frecuencia de aplicación de los biolarvicidas durante el estudio fue de 30 días debido al gran número de criaderos a tratar y de que no se estudiaron los factores que influyeron en la efectividad de estos en los sitios tratados, se pudo comprobar que la presencia de larvas de mosquitos en cada mes en el total de sitios tratados se redujo en casi un 40 % a los 21 días después de la aplicación, dato importante para establecer el retratamiento en zonas donde se presente aumentos en la transmisión de malaria

Con estos resultados, además podemos afirmar que los biolarvicidas fueron efectivos en la reducción de las poblaciones larvales de culicineos y anofelinos. Estudios realizados en Kenya,²⁶ demostraron iguales resultados y abogaron por integrar el uso de biolarvicidas junto a los métodos convencionales adulticidas como el uso de mosquiteros impregnados y la a pulverización intradomiciliar residual, para un mayor impacto en la reducción de malaria, situación que pudiera ampliarse en Angola.

Por otra parte, con el uso de los biolarvicidas se controlan también vectores como *An. arabiensis* con conducta generalmente exofágica y exofilica² y considerado un vector secundario de malaria distribuido en gran parte de Angola que escapa a los métodos adulticidas utilizados en el país.

Limitaciones del estudio

Este estudio fue realizado en áreas donde se aplican los biolarvicidas desde el año 2009, por lo que no fue posible trabajar con un área control.

Por el gran número de sitios de cría monitoreados no fue posible determinar la densidad larvaria relativa y hacer el cálculo del porcentaje de reducción larvaria, lo cual hubiera dado información más precisa para la determinación de la residualidad en función de los diferentes sitios estudiados.

Consideramos que a pesar de las limitaciones señaladas en el trabajo, sería oportuno dar a conocer estos resultados preliminares sobre la acción de los biolarvicidas en las poblaciones de los vectores de malaria y otros culícidos, debido a la ausencia de evidencias científicas que avalen la efectividad y residualidad de estos en Angola.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Salud de Angola; al Dr. Filomeno Fortes, Jefe del Programa Nacional de Malaria; a la Dirección Provincial y Municipal de Salud de Luanda; a las brigadas angolanas dedicadas a la lucha antivectorial, junto a los asesores cubanos de LABIOFAM y a la población del municipio de Luanda por su contribución y apoyo diario para la realización de este trabajo.

Conflictos de interés

Los autores no declaran conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World Malaria Report. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasite & Vectors*. 2010;3: 117. doi: 10.1186/1756-3305-3-117.
3. Marquetti MC, Rojas L, Birniwa MM, Sulaiman HU, Adamu HH. Identificación de los sitios de cría de *Anopheles* sp. durante parte de la estación seca en el estado de Jigawa, Nigeria. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;59:166-8.
4. Marquetti MC, Rojas L, Pomier O. Asesoría cubana en el control de los vectores de malaria durante un brote epidémico en Jamaica y en dos países endémicos de África. *Rev Biomédica*. 2008;19:17-25.

5. Mendizábal Alcalá ME, Peraza Cuesta I, Pérez Castillo M, Valdés Miró V, Molina Torriente RE, Marquetti Fernández MC. Presencia larval de *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) en La Habana, Cuba 2010-2012. Rev Cubana Med Trop. 2014;66:2.
6. Vivanco M. Muestreo Estadístico. Diseño y Aplicaciones. Santiago de Chile: Editorial Universitaria SA; 2012.
7. González R. Culícidos de Cuba. 2da. Ed. La Habana: Editorial Científico Técnica; 2006.
8. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005/3. Geneva: World Health Organization; 2005.
9. World Health Organization. Manual on practical entomology in Malaria. Methods and Techniques. Part II. Geneva: World Health Organization; 1975.
10. World Health Organization. International programme on chemical safety (IPCS): Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. Environ Health Criteria. 1999;217:1-105.
11. Fillinger U, Ndenga B, Githeko A, Lindsay SW. Integrated malaria vector control with microbial larvicides and insecticide-treated net in western Kenya a controlled trial. Bull World Health Org. 2009;87:655-65.
12. Fillinger U, Knols Bart GJ, Becker N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. Tropical Medicine International Health. 2003;8:37-47.
13. Filinger U, Sonye G, Killeen GF, Knols Bart GJ, Becker N. The practical importance of permanent and semi-permanent habitats for controlling aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu lato* mosquitoes: operational observations from a rural town in western Kenya. Trop Med Intern Health. 2004;9:1274-89.
14. Das PK, Amalraj DD. Biological control of malaria vectors. Indian J Med Res. 1997;106:174-97.
15. Karch S, Manzambi ZM, Salaun JJ. Field trials with Vectolex (*Bacillus shaericus*) and Vectobac (*Bacillus thuringiensis* H-14) against *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* breeding in Zaire. J Am Mosq Control Assoc. 1991;7:176-9.
16. Becker N, Zgomba M, Petri D, Beck M, Ludwing M. Role of larval cadavers in recycling processes of *Bacillus sphaericus*. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11:329-34.
17. World Health Organization. Report of the ninth WHOPES working group meeting. Document WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2. Geneva: World Health Organization; 2006.
18. Corbillón CO, González A, Menéndez Z, Companioni A, Bruzón RY, Díaz M, Gato R. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var-*israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Cubana Med Trop. 2012;64:235-43.

19. Cruz Pineda C, Montero Lagos G, Navarro Ortega A, Morejón Martín PL. Control de culícidos con el empleo de *Bacillus thuringiensis SH-14 var. Israeliensis* en criaderos permanentes de la localidad de Fomento, provincia Sancti Spiritus, Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2005;57(3).
20. Afrane YA, Klinkenberg E, Drechsel P, Owusu-Daaku K, Garms R, Kruppa T. Does irrigated urban agriculture influence the transmission of malaria in the city of Kumasi, Ghana? Acta Trop. 2004;89:125-34.
21. Sattler MA, Mtasiwa D, Kiama M, Premji Z, Killen GF, Lengeler C. Habitat characterization and spatial distribution of *Anopheles* sp. Mosquito larvae in Dar es Salaam (Tanzania) during an extended dry period. Malar J 2005;4:40-53.
22. Al-Ahmed A. Kheir SM, Sallam M. Breeding habitats characterization of Anopheles mosquito (Diptera: Culicidae) in Najran Province, Saudi Arabia. J Egypt Soc Parasitol. 2011;41:273-86.
23. Rubio-Palis Y, Zimmerman RH. Ecoregion classification of malaria vectors in the Neotropics. J Med Entomol. 1997;34:499-510.
24. Cox J, Mouchet J, Bradley DJ. Determinants of malaria in Sub-Saharan Africa. In: Casman EA, Dowlatabadi H, editors. The Contextual Determinants of Malaria. Washington, DC: Edition Resources for the Future; 2002. p. 167-86.
25. Trape JF, Pison G, Spiegel A, Engel C, Rogier C. Combating malaria in Africa. Trends Parasitol. 2002;8:224-30.
26. Minakawa N, Sonye G, Futami K, Kaneko S, Mushinzimana E, Fillinger U. A large-scale field trial to evaluate the efficacy of bacillus larvicides for controlling malaria in western Kenya: Study design and methods. Trop Med Health. 2007;35:41-5.

Recibido: 9 de enero de 2017.

Aceptado: 17 de julio de 2017.

María del Carmen Marquetti Fernández. Instituto Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba. Correo electrónico: marquetti@ipk.sld.cu; nanibisset2@gmail.com; mcmf@infomed.sld.cu