

USO DE MARCADORES GENETICOS EN LA VIGILANCIA ENTOMOLOGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Dujardin J.P. ¹, Bermudez H. ², Gianella A. ³, Cardozo L. ³, Ramos E. ⁴,
Saravia R. ⁴, Quiroz K. ⁵, Forgues G. ⁵, Carazas R. ⁵, Hervas D. ⁶,
Chavez T. ⁶, Machane M. ⁶, Martinez E. ⁶ & Torrez M. ⁶

Introducción

En Bolivia, la enfermedad de Chagas constituye uno de los problemas de salud prioritarios: encuestas serológicas estimaron su prevalencia en el 40% de los habitantes, principalmente en los valles y climas subtropicales (Valencia Tellería, 1990). La vía de transmisión de la enfermedad al hombre en América Latina se realiza mayormente (80%) a través de la transmisión vectorial, debiéndose más de la mitad de los casos a la actividad del *Triatoma infestans* (Schofield, 1994). En Bolivia, *T. infestans* es conocido como el principal vector de la enfermedad, cuya distribución geográfica corresponde a la de esta especie. Hasta el momento no existe para la enfermedad de Chagas un tratamiento terapéutico ni una prevención inmunológica aplicable a la gran masa de habitantes expuestos al riesgo de infección. Por consecuencia, el control de la enfermedad principalmente se basa en la eliminación del vector domiciliario. Este objetivo se logra a corto plazo a través de fumigaciones intra y peridomiciliarias con insecticidas piretroides sintéticos, como se ha podido demostrar en el Brasil (Dias, 1987; WHO, 1991; Schofield, 1992), y más recientemente en Uruguay, en Chile y en Argentina (Report of the Initiative of the Southern Cone for the elimination of Chagas disease, Montevideo, March 21-23 1994).

¹ IRD, La Paz, Bolivia.

² CUMETROP, Cochabamba, Bolivia.

³ CENETROP, Santa Cruz, Bolivia.

⁴ Universidad Evangélica, Santa Cruz, Bolivia.

⁵ UMSA, La Paz, Bolivia.

⁶ IBBA, La Paz, Bolivia.

Sin embargo, todos estos programas registran una tasa promedio de reinfestación por la misma especie de alrededor de 5%. Por consecuencia, es muy importante organizar una vigilancia entomológica eficaz, y en los casos de reinfestación, brindar una respuesta adecuada capaz de reducir los riesgos de otras futuras reinfestaciones. Para adecuar la respuesta, es importante comprender cuáles son los mecanismos de reinfestación por *T. infestans*. Fuera de la hipótesis de resistencia a los insecticidas, que hasta la fecha no se ha observado en *T. infestans*, dos hipótesis son posibles: 1) Población residual (RES): los nuevos individuos surgen de poblaciones residuales que sobrevivieron a la primera fase de fumigación; (2) Población de reinvasión (INV): los reinfestantes vienen de focos vecinos, domésticos o silvestres (aunque estos últimos sean excepcionales), no o insuficientemente tratados. La elección entre las dos hipótesis significa tomar decisiones de impacto económico diferente. En el primer caso, basta con volver a fumigar en el mismo lugar, pero en el segundo caso, hay que rociar por lo menos dos lugares: la población tratada anteriormente y la población fuente de la reinvasión.

Metodología

Principio

Hipótesis principal: $R = RES$; los reinfestantes son sobrevivientes no alcanzados por la intervención;

Hipótesis alterna: $R = INV$: los reinfestantes fueron transportados, o llegaron activamente, desde un foco vecino.

Para lograr hacer la distinción entre una población de reinvasión (INV) y una población residual (RES), necesitamos conocer el perfil genético de tres tipos de poblaciones, definidas de la siguiente manera:

- I: es la población inicial, es decir la población de triatomas existente en un lugar antes del rociado.
- R: es la población de reinfestación, que puede resultar de una reinvasión (INV) o de un foco residual (RES).
- V: son las poblaciones vecinas a la población I.

Cronológicamente, R siempre es posterior a I; V puede ser contemporáneo de I, o más bien V es contemporáneo de R (Tabla 1). Basándose en estas distinciones, las cuatro figuras posibles son las siguientes:

$I = R$ y $R \neq V$

$I \neq R$ y $R = V$

$I \neq R$ y $R \neq V$

$I = R$ y $R = V$

Si $I = R$ y $R \neq V$, podemos decir que $R = RES$;

Si $I \neq R$ y $R = V$, podemos rechazar $R = RES$ y concluir que $R = INV$;

Si $I \neq R$ y $R \neq V$, podemos rechazar $R = RES$, pero es necesario investigar otras poblaciones V para buscar la fuente de reinfestación;

Si $I = R$ y $R = V$, se puede tratar de una reinfestación mixta, individuos de RES y de INV , pero no podemos concluir, y debemos recomendar de tratar nuevamente I e V de igual manera.

Según el método de comparación utilizado, las diferencias ($I \neq R$, $R \neq V$) pueden estar asociadas a un riesgo de error, lo que permite presentar los resultados a los responsables de control en forma de “ayuda a la toma de decisión”: la decisión de rociar únicamente el pueblo reinfestado (R), o también las localidades vecinas (V).

Hicimos este análisis en 3 experimentos (Tabla 1). El primero (Experimento 1) sobre poblaciones de la zona de Vallegrande utilizando como método de comparación la electroforesis de las isoenzimas (Dujardin *et al.*, 1996), el segundo (Experimento 2) lo hicimos en la zona de Cochabamba utilizando la morfometría de la cabeza (Dujardin *et al.*, 1997), y el tercero (Experimento 3) en la Provincia Cordillera, combinando sobre los mismos especímenes el análisis electroforetico y la morfometría.

Tabla 1. Experimentos

Experimentos	I	R	V
Exp. 1.	Moro Moro 1986	Moro Moro 1987	Candelaria 1986 San Gerónimo 1986 El Bello 1987
Exp. 2.	Jamach'Uma 1992	Jamach'Uma 1993	Focos silvestres 1992 Focos silvestres 1993 Focos silvestres 1995
Exp. 3.	Abapo 1996	Abapo 1997	Río Seco

I = población inicial, V = población vecina, R = población de reinfestación

Electroforesis de las isoenzimas

Generalidades sobre la electroforesis de las isoenzimas aplicadas a los Triatominae se pueden encontrar en Frias & Dujardin (1997). La comparación de las frecuencias génicas de cada población, I, R y V, se hizo sobre la base de dos conceptos: el concepto de probabilidad (Tabla 2), y el concepto de distancia genética (Figura 1). El análisis en base a las probabilidades fue explicado en Dujardin *et al.* (1996). Se trata de medir el riesgo de equivocarse en rechazar una población como fuente de reinfestación. Un riesgo de valor mínimo permite rechazar la población como fuente de los reinfestantes. Este análisis se hace locus por locus (enzima por enzima), y luego se suman los riesgos en un análisis combinando los diferentes loci (“meta-análisis”) según la fórmula $X^2 = -\ln S(\Pi)$ (Dujardin *et al.*, 1996). El análisis basado sobre las distancias genéticas utilizó las distancias de Rogers. Son distancias euclidianas que varían entre 0 (mínima distancia) y 1 (máxima distancia), más adaptadas a la comparación de poblaciones vecinas que la distancia de Nei que varía entre 0 y el infinito.

Morfometría

Para comparar las poblaciones I, R y V, utilizamos caracteres de la cabeza y/o las alas: cabezas de ninfas 5 en el Experimento 2, cabezas de machos y hembras así como sus alas en el Experimento 3. En ambos casos un análisis multivariado fue utilizado llamado “análisis discriminante”, también conocido bajo otras apelaciones como “análisis canónico”. El análisis multivariado combina los caracteres iniciales de la cabeza en “nuevas variables” sin correlación entre sí, llamadas “factores”, los cuales pueden utilizarse como coordenadas cartesianas para construir “mapas factoriales” que ubican cada población en un “espacio discriminante”. Del mismo análisis discriminante, se pueden derivar distancias métricas llamadas distancias de Mahalanobis, a partir de las cuales se construyen árboles de clasificación (Figuras 2 & 3). Dos análisis discriminantes se pueden realizar, el uno incluyendo el tamaño (AD-TI, Figuras 2 & 3, arriba), el otro excluyendo el tamaño (AD-TE, Figuras 2 & 3, abajo). Este último análisis, el análisis excluyendo el tamaño (AD-TE) es un análisis de la “forma” de los individuos.

Resultados

Experimento 1 (I = R y R ≠ V)

Este experimento se basó exclusivamente en la electroforesis de las isoenzimas. La Tabla 2 presenta las comparaciones entre las frecuencias génicas a dos

loci enzimáticos, combinados en una sola prueba estadística (Dujardin *et al.*, 1996). El perfil genético de la población de reinfestación (R), encontrada en Moro Moro (Vallegrande) seis meses después de la fumigación, no se puede diferenciar ($P = 0.50$) de la población inicial (I) capturada en Moro Moro antes del rociado en 1986 (Tabla 2, Exp. 1). Por otra parte, los especímenes reinfestantes son muy diferentes ($P < 0.01$) a los especímenes colectados en las poblaciones vecinas (El Bello, San Gerónimo o Candelaria). Estos resultados se ilustran en la Figura 1, parte superior.

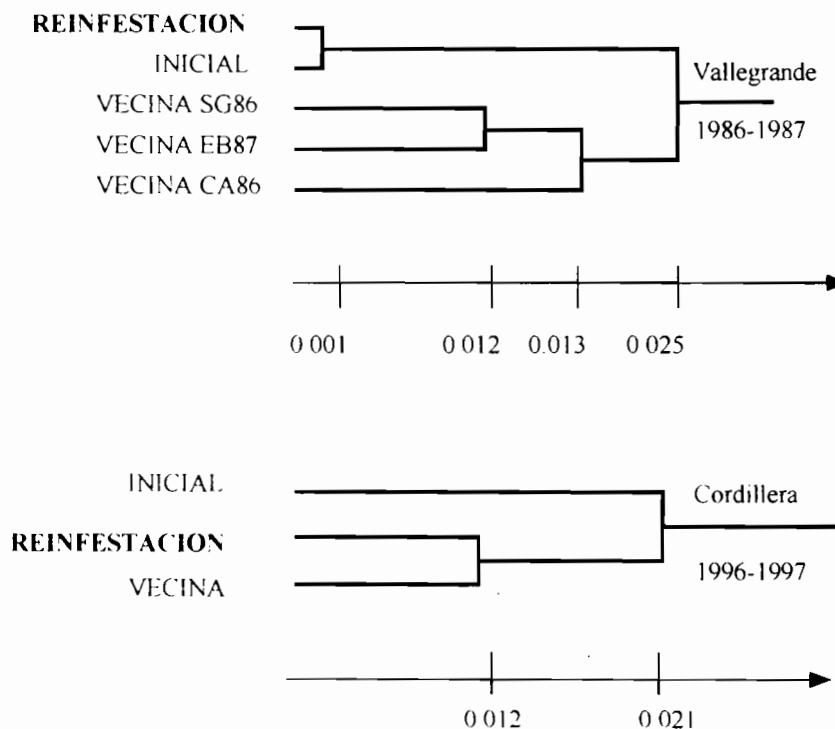


Figura 1. Dendrogramas UPGMA ("unweighted pair-group method with arithmetic mean") basados en las distancias de Rogers que miden diferencias alélicas globales entre poblaciones. En Vallegrande (experimento 1), la población inicial (Moro Moro, 1986) fue comparada con la población de reinfestación (Moro Moro, 1987) así como con tres poblaciones vecinas: Candelaria (CA: individuos colectados en 1986), San Gerónimo (SG: individuos colectados en 1986) y El Bello (EB: individuos colectados en 1987). En la provincia Cordillera (experimento 3), la población inicial (Abapo, individuos colectados en noviembre 1995) fue comparada con la población de reinfestación (Abapo, individuos colectados en mayo 1996 y julio 1997) así como con una población vecina (TCB, 1997).

Experimento 2 ($I = R$ y $R \neq V$)

Este experimento se basó exclusivamente en la morfometría. Se muestra en la Figura 2 el resultado del análisis morfométrico comparando una población de reforestación con la población inicial y las vecinas. En este estudio, las poblaciones vecinas son los focos silvestres de *T. infestans* en el valle de Cochabamba, mientras la población inicial, rociada en 1992 y reforestada en 1993, es el pueblo de Jamach'Uma. El árbol (Figura 2) muestra que las poblaciones iniciales y de reforestación (respectivamente I y R) se asemejan bastante mientras que ambas son muy diferentes a las de los focos silvestres (V).

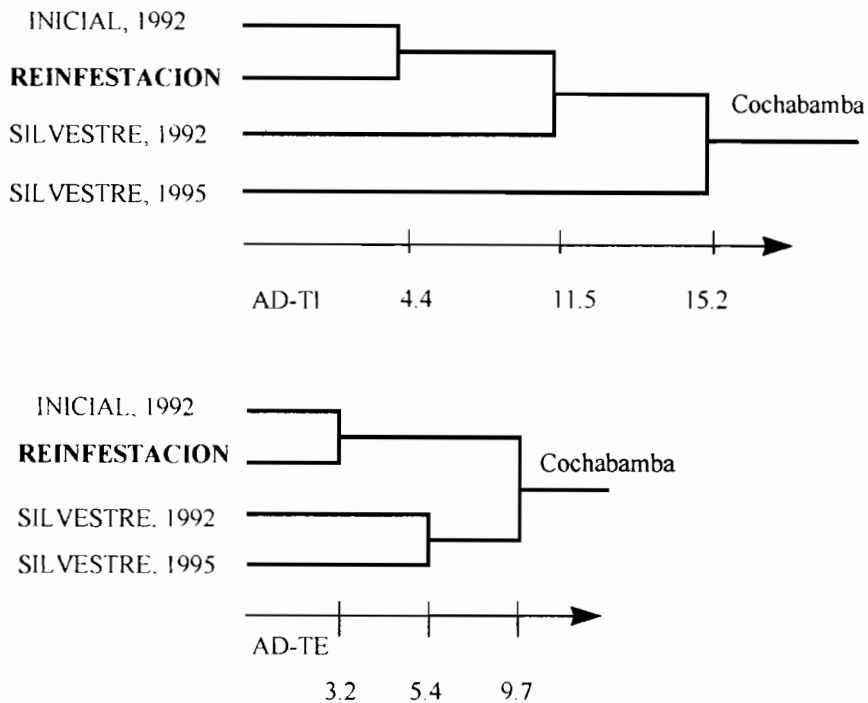


Figura 2. Dendrogramas UPGMA (“unweighted pair-group method with arithmetic mean”) basados en las distancias de Mahalanobis que miden diferencias métricas globales entre poblaciones. En la zona de Cochabamba (experimento 2), la población inicial (Jamach'Uma, individuos colectados en 1992) fue comparada con la población de reforestación (Jamach'Uma, individuos colectados en 1993) así como con dos poblaciones vecinas: individuos colectados en el foco silvestre en 1992 y en 1995.

AD-TI: análisis discriminante tamaño incluido; AD-TE: análisis discriminante tamaño excluido.

Experimento 3 ($I \neq R$ y $R = V$)

Este experimento se basó en la morfometría y la electroforesis de las isoenzimas aplicadas a los mismos especímenes. La morfometría, tanto de los machos como de las hembras, nos indica que la población de reinfestación difiere de la población inicial y es más parecida a la población vecina (Figura 3). Estas relaciones ($I \neq R$ y $R = V$) se verifican tanto para el análisis de los tamaños (AD-TI, Figura 3, arriba) como para el análisis de la forma (AD-TE, Figura 3, abajo). Deberíamos concluir en este experimento en una reinvasión de Abapo a partir de poblaciones vecinas (hipótesis INV). Con la electroforesis de las isoenzimas, se puede afinar la interpretación. Según el examen de las probabilidades, I es significativamente diferente de R, lo que nos permite descartar la hipótesis de una población residual (Tabla 2, Exp. 3, $P < 0.00$), pero I no es significativamente diferente de V (Tabla 2, Exp. 3, $P = 0.06$). El examen de las distancias

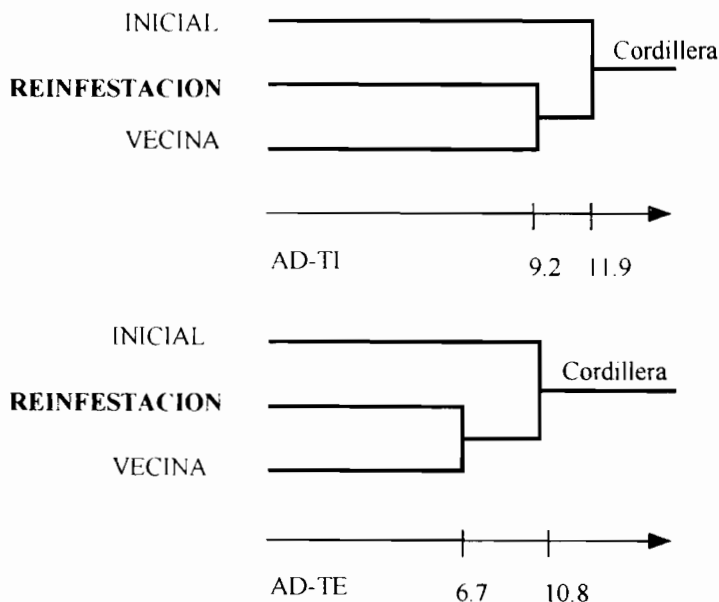


Figura 3. Dendrogramas UPGMA (“unweighted pair-group method with arithmetic mean”) basados en las distancias de Mahalanobis que miden diferencias métricas globales entre poblaciones. En la provincia Cordillera, la población inicial (Abapo, individuos colectados en noviembre 1995) fue comparada con la población de reinfestación (Abapo, individuos colectados en mayo 1996 y julio 1997) así como con una población vecina (TCB, 1997).

genéticas permite una ilustración más sencilla: se encuentra más cerca de la población vecina (I=V), lo que sugiere la posibilidad de una reinfestación a partir de la población vecina (Figura 1, abajo).

Tabla 2. Estadística combinada entre dos loci

Experimentos	Hipótesis	X ²	grados de libertad	Significación
Exp. 1	I = R	3.02	4	0.50
Vallegrande	V = R	15.92	4	< 0.01
Exp. 3	I = R	34.64	4	< 0.00
Cordillera	V = R	9.14	4	0.06

Chi-cuadrado ($X^2 = -2 \cdot \ln\{P_i\}$) derivado de pruebas estadísticas para dos loci isoenzimáticos (6Pgdh y Pgm)

Discusión

Discusión sobre la metodología

Electroforesis de las isoenzimas

El uso de la electroforesis de las isoenzimas para reconocer el origen microgeográfico de poblaciones de *T. infestans* puede parecer una tarea imposible cuando se considera el polimorfismo reducido del insecto: en acetato de celulosa, solamente 3 enzimas (PGM, 6PGDH y GPD) sobre 11 presentan polimorfismo (Dujardin & Tibayrenc, 1985). Se podría recomendar el uso de otras técnicas en las cuales se revela más polimorfismo para *T. infestans*, como por ejemplo la electroforesis en gel de almidón (García *et al.*, 1996). En realidad, no es indispensable: estudios previos (Dujardin & Tibayrenc, 1985; Dujardin *et al.*, 1988; Dujardin *et al.*, 1997c) demostraron ampliamente que diferencias genéticas, a veces reveladas por una sola enzima, existen entre cada población local de *T. infestans*. Esta especie se caracteriza por una estructuración poblacional muy marcada, haciendo que generalmente dos pueblos, aún vecinos, muestran diferencias significativas de frecuencias génicas, por lo menos para una enzima (Dujardin *et al.*, 1994; Dujardin *et al.*, 1997c).

Por otra parte, el uso de la electroforesis de las isoenzimas para reconocer una población residual supone que la población de reinfestación no ha sufrido cambios en sus frecuencias génicas a consecuencia de la intervención de con-

trol. En efecto, en caso de sobrevivir una población residual, los individuos son poco numerosos, y tal vez ya no son representativos de la variabilidad genética inicial. Dos argumentos permiten pensar que, sin embargo, el marcador genético sigue siendo utilizable: i) el tiempo de generación de *T. infestans* y ii) el análisis estadístico recomendado:

- i) Para que se desarrollen diferencias de frecuencias génicas entre poblaciones, se necesitan varias generaciones (el número de generaciones se puede estimar en base al número de fundadores de cada población). Generalmente, una población de reinfestación se detecta en los meses que siguen a la intervención. Cuando comparamos la población de reinfestación con la población inicial o la población vecina, comparamos muy probablemente individuos de la misma generación porque el tiempo de una generación en *T. infestans* va de 6 meses a 1 año.
- ii) El enfoque probabilístico, recomendado para estudiar los individuos de reinfestación (Dujardin *et al.*, 1996), se basa en la “teoría de la decisión”, muy utilizada en ciencias económicas, y permite explorar un número reducido de individuos. Generalmente, tenemos bastantes individuos de la población inicial y de la población vecina, pero pocos reinfestantes. En la comparación estadística no se utiliza la variancia de los reinfestantes, se utiliza la variancia de la población que se supone es la fuente de la población de reinfestación.

Finalmente, el análisis combinando los diferentes loci considerados es automatizado únicamente si estos últimos son independientes. En *T. infestans*, no existe ligamento genético detectable entre la PGM y la 6PGDH (Dujardin *et al.*, 1997).

Morfometría.

El enfoque de la morfometría recién se está desarrollando en el estudio de los Triatominae, revelando también una diferenciación microgeográfica muy marcada entre cada población de *T. infestans* (Casini *et al.*, 1995; Dujardin & Casini, 1997). Según Falconer (1981), el “carácter métrico” es el primero en cambiar en poblaciones entre las cuales se instala una separación física. Sería un carácter más sensible que un carácter molecular como la variación proteica (Dujardin *et al.*, 1997b), y los experimentos 2 y 3 demuestran ampliamente que poblaciones, aún muy vecinas, sí presentan diferencias métricas marcadas. Un estudio reciente sobre otro Triatominae de Bolivia que merece vigilancia, *P.*

rufotuberculatus confirma el interés de la morfometría en el estudio de la variación microgeográfica (Dujardin *et al.*, 1997d).

La ventaja principal del uso de la morfometría es su bajo costo, aunque esto puede depender de las técnicas de recolección de las mediciones. Otra ventaja no despreciable es la facilidad de conservación de los insectos: secos o en alcohol, enteros o parciales, el material siempre se presta a algún análisis morfométrico.

Utilizamos dos enfoques, el uno comparando los tamaños de los individuos, el otro intentando comparar su forma.

Discusión sobre los resultados

En los experimentos 1 y 2, tenemos $I = R$ y $R \neq V$, de manera que podemos concluir en la existencia de un foco residual, explicándose así la reinfestación de los pueblos tratados. En el experimento 3, tenemos $I \neq R$ y $R = V$, los resultados apuntan a una posible reinvasión a partir de focos vecinos.

Experimento 1 (Figura 1, parte superior)

Este experimento aporta la prueba de que las isoenzimas se pueden utilizar para reconocer poblaciones vecinas, aún en una zona donde la diferenciación isoenzimática es menos marcada que en otras (Dujardin, 1990; Dujardin *et al.*, 1994; Dujardin *et al.*, 1997).

Experimento 2 (Figura 2)

Los *T. infestans* silvestres fueron descubiertos por primera vez por Torrico (1948), que capturó bajo piedras 31 *T. infestans* juntos con *T. sordida* en los cerros de Cochabamba. Este foco fue reestudiado 40 años después: los especímenes silvestres no revelaron evidencia de ser otra especie, y la hipótesis de una invasión de ecotopos silvestres por especímenes domésticos no pudo ser descartada (Dujardin *et al.*, 1987). Recientemente, estudios moleculares (Carlier *et al.*, 1997) y morfométricos (Dujardin *et al.*, 1997) revelaron sin embargo una diferenciación entre los dos ecotopos. Aunque otros focos silvestres fueron recientemente sospechados (Bermudez *et al.*, 1993; Noireau *et al.*, 1997), el foco de Cochabamba es el único lugar donde se pudo comprobar la existencia de un ciclo completo, del huevo al adulto, en asociación con roedores silvestres (*Galea musteloides*) (Dujardin *et al.*, 1987; Dujardin *et al.*, 1997).

Es importante destacar que aparentemente no hubo evidencia de reinvasión de Jamach' Uma por parte de los focos silvestres.

Otra prueba del aislamiento de los focos silvestres fue aportada por un experimento dirigido por el Dr. H. Bermudez. Gallineros centinelas fueron construidos a lo largo de una línea conectando Jamach'Uma con los focos silvestres más cercanos y fueron desmantelados cada mes en busca de colonización por *T. infestans*. Durante más de un año, no hubo ninguna colonización por *T. infestans*, pero sí por *T. sordida*.

Experimento 3 (Figura 1, parte inferior; Figura 3)

Esta investigación fue integrada al proyecto TDR dirigido por el Dr. A. Gianella (T80/181/61, UNDP/World Bank/WHO), proyecto donde diferentes tipos de aplicación del insecticida fueron comparados en la Provincia Cordillera. En nuestra experiencia, este experimento es el primero en revelar la posibilidad de reinvasión por focos vecinos, y también es el primero en mostrar la coherencia, en este tipo de análisis, entre las informaciones brindadas por la electroforesis de las isoenzimas y la morfometría. El mecanismo de reinvasión sigue siendo, sin embargo, desconocido, pudo ser un transporte pasivo, pudo ser también un desplazamiento activo, por vuelo, o ambos mecanismos.

Conclusiones

1. El estudio del origen de las reinfestaciones es posible mediante el uso de la morfometría, la electroforesis de las isoenzimas, o ambas técnicas aplicadas a los mismos especímenes.

2. En el límite de este estudio, parece que los “focos silvestres” de Cochabamba no presentan un riesgo elevado de reinvasión de las zonas domésticas tratadas. Por consecuencia, no hay razón para descartar en Bolivia la estrategia de lucha contra *T. infestans* tal como es recomendada en el Cono Sur.

Glosario

I: Población inicial = población a tratar;

V: Poblaciones vecinas = poblaciones inmediatamente vecinas de la población inicial, que se consideraran después como posibles fuentes de reinfestación (en el caso de una reinvasión);

R: Población de reinfestación = triatominos que nuevamente aparecen en los domicilios un tiempo después del rociado;

RES: Población residual = triatominos de reinfestación (R) resultando de la persistencia de individuos que sobrevivieron el rociado ($R = I$);

INV: Población de reinvasión = triatominos de reinfestación (R) resultando de una migración, pasiva o activa, de individuos perteneciendo a otra población ($R = V$).

Referencias

- Bermúdez, H., Balderrama, F. & Torrico, F. (1993). Identification and characterization of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Central Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**, 371.
- Carlier, L., Muñoz, M. & Dujardin, J.P. (1996). RAPD Protocol for Triatominae, pp. 81-83. In *Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*, Schofield, C.J., Dujardin, J.P. & Jurberg, J. (editors), Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. INDRE, Mexico City, 116 pp.
- Casini, C.E., Dujardin, J.P., Martinez, M., Pereira, A.B. & Salvatella, R. (1995). Morphometric differentiation evidenced between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. *Research and Reviews in Parasitology.*, **55**, 25-30.
- Dias, J.C.P. (1987). Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today*, **3**, 11.
- Dujardin, J.P. & Tibayrenc, M. (1985). Etudes isoenzymatiques du vecteur principal de la maladie de Chagas: *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, **65**, Suppl. 1, 165-169.
- Dujardin, J.P. (1990). Intérêt de la génétique des populations dans l'étude des vecteurs de la trypanosomiase américaine. *Thèse de Doctorat en Sciences Biomédicales expérimentales*, Université de Liège, Belgique.
- Dujardin, J.P. & Casini, C. (1996). Morphometry of *Triatoma infestans*, pp. 53-54. In *Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*, Schofield, C.J., Dujardin, J.P. & Jurberg, J. (editors), Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. INDRE, Mexico City, 116 pp.
- Dujardin, J.P., Cardozo, L. & Schofield, C.J. (1996). Genetic analysis of *Triatoma*

- infestans* following insecticidal control interventions in central Bolivia. *Acta Tropica*, **61**, 263-266.
- Dujardin, J.P., Bermudez, H. & Schofield, C.J. (1997a). The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Tropica*, **66**, 145-153.
- Dujardin, J.P., Bermudez, H., Casini, C., Schofield, C.J. & Tibayrenc, M. (1997b). Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) in Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, **34**, 544-551.
- Dujardin, J.P., Schofield, C.J. & Tibayrenc, M. (1997c). Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 20-29.
- Dujardin, J.P. (1999). *La morfometría tradicional en entomología médica*. Eurocommunica Publications, West Sussex PO22 9RR, UK, pp. 80.
- Frias, D. & Dujardin, J.P. (1996). Detección de la variación genética a nivel poblacional a través del método de electroforesis. pp. 65-71. In *Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*, Schofield, C.J., Dujardin, J.P. & Jurberg, J. (editors), Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. INDRE, Mexico City, 116 pp.
- Noireau F., Flores R. Gutierrez T. & Dujardin J.P. (1997) Detection of sylvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**, 583-584.
- Schofield, C.J. (1992). Eradication of *Triatoma infestans*: a new regional programme for Southern Latin America. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, **72**, Suppl. 1, 69-70.
- Schofield, C.J. (1994). *Triatominae: Biología y Control*. Eurocommunica Publications, West Sussex PO22 9RR, UK, 80 pp.
- Schofield, C.J. & Dujardin, J.P. (1997). Chagas disease vector control in Central America. *Parasitology Today*, **13**, 141-144.
- Valencia Tellería, A. (1990). *Investigación epidemiológica nacional de la enfermedad de Chagas*. Ministerio de Previsión Social y Salud Pública, La Paz, 184 pp.
- WHO (1991). *Control of Chagas disease*. WHO Technical Report Series 811, World Health Organization, Geneva, 95 pp.