

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**



**FACTORES DE HETEROGENEIDAD EN LA  
DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE  
INFECCIÓN EN *TRIATOMA INFESTANS* POR  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

**Tesis de grado para optar al Título Académico de Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Natalie Herrera Salazar**

**Tutor administrativo:** Ms. Sc. Rolando Sánchez.

**Asesor científico:** Dr. Frédéric Lardeux.

**La Paz - Bolivia**

**2015**

**Factores de heterogeneidad en la determinación  
de la prevalencia de infección en *Triatoma  
infestans* por *Trypanosoma cruzi***

Natalie Herrera Salazar.

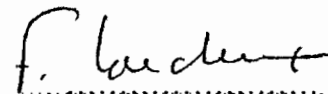
**Tutor Administrativo:**

MS. Sc. Rolando Sánchez

.....

**Asesor científico:**

Dr. Frédéric Lardeux



**Tribunales:**

Dra. Alejandra Salas

.....

Dra. Gloria Rodrigo

.....

**Jefa de la Carrera de Biología:**

Lic. Esther Valenzuela

.....

# Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado y realizado en el marco del proyecto “An eco-bio-social approach to the control of *Triatoma infestans* in poor communities of Bolivia”, financiado por la Organización Mundial para la Salud – Tropical Disease Research (OMS-TDR) y la Cooperación Canadiense (IDRC) Proyecto N°A90281 , y del proyecto de la Agence Nationale de la Recherche (ANR, Francia) “ALTERNATIVES: What alternatives to the chemical control of *Triatoma infestans*?”, Proyecto N°10 CESA 018 01. Estos proyectos fueron desarrollados en Bolivia por el Instituto de Cooperación para el Desarrollo de la República de Francia (IRD) en colaboración con el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) en La Paz y la Universidad René Gabriel Moreno de Santa Cruz.

Un gran agradecimiento a la Dra. Tamara Chávez, Responsable del Laboratorio de Entomología Médica (INLASA-La Paz), quien facilitó las muestras y las instalaciones donde fueron procesadas, y sobre todo por su paciencia y comprensión.

Un agradecimiento especial al Dr. Frédéric Lardeux (IRD) quien además del financiamiento, me guió con dedicación y paciencia, apoyando en todo momento la realización del presente trabajo, además por la revisión constante del manuscrito.

A mi tutor el Ms. Sc. Rolando Sánchez (Don Gato), quien me apoyó desde el inicio, gracias por su comprensión, confianza y consejos.

También agradecer los sabios consejos, el apoyo y la amistad a todas las personas que estuvieron junto a mí, entre las que están: Claudia Aliaga, Renata Salas, Sergio Quisbert, Stephanie Depickère, Rosario Colque, Alberto Llanos, Gino Torrico, Guillermo Aliaga, Edda Siñani, Libia Torrez, Natividad Poma, Alex Cornejo.

Agradecer también a la Dra. Volga Iñiguez, quien me inspira a explotar mis capacidades y sobrepasar mis límites. Y al alquimista catalizador final de esta reacción.

Por último agradecer a mis progenitores: Lucila Salazar y José Herrera, pues sin ellos no estaría en esta vida, caminando y creciendo hacia la luz de la sabiduría, con pasión por la vida y el conocimiento. Y como diría Cerati: ¡Gracias Totales!

# Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	4
2.2. TRIATOMA INFESTANS, PRINCIPAL VECTOR EN BOLIVIA .....	5
2.2.1. Bio-ecología de <i>T. infestans</i> .....	5
2.2.2. Ciclo de transmisión vectorial y capacidad vectorial de <i>T. infestans</i> .....	7
2.3. MANEJO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN <i>T. INFESTANS</i> EN EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	9
2.4. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN EL CÁLCULO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN <i>T. INFESTANS</i> .....	12
2.4.1. Factores biológicos del vector .....	12
2.4.1.1. Densidades de <i>T. infestans</i> y frecuencia de alimentación .....	12
2.4.1.2. Proporción de mamíferos infectados y preferencias tróficas .....	13
2.4.1.3. Tasa de ingestión (TI) según edad del vector .....	13
2.4.1.4. Factores fisiológicos.....	14
2.4.2. Factores ambientales .....	14
2.5. CALCULO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN EL VECTOR.....	15
2.5.1. Identificación de los parásitos por microscopía.....	15
2.5.2. Identificación de los parásitos por técnicas de biología molecular .....	15
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>17</b>
3.1. SITIO DE ESTUDIO .....	17
3.2. COLECTA DE TRIATOMA INFESTANS.....	21
3.3. DETECCIÓN DE <i>T. CRUZI</i> EN LOS INSECTOS POR PCR.....	22
3.3.1. Extracción del ADN .....	22
3.3.2. Identificación y caracterización de <i>T. cruzi</i> por PCR .....	23
3.4. ANÁLISIS DE HETEROGENEIDADES EN EL CÁLCULO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN ....	24

3.4.1. <i>Análisis de la dimensión temporal de heterogeneidad</i> .....	25
3.4.2. <i>Análisis de la dimensión espacial de heterogeneidad</i> .....	25
3.5. <i>COMPARACIÓN DE ESTRATEGIAS DE MUESTREO EN EL CAMPO POR SIMULACIONES</i> .....	26
3.6. <i>PRUEBAS ESTADÍSTICAS</i> .....	27
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. <i>DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES EN ESTUDIO</i> .....	29
4.2. <i>HETEROGENEIDAD DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN ENTRE COMUNIDADES</i> .....	30
4.3. <i>HETEROGENEIDAD ENTRE VIVIENDAS DE UNA MISMA COMUNIDAD</i> .....	31
4.4. <i>HETEROGENEIDAD ENTRE ESTRUCTURAS DE UNA MISMA VIVIENDA Y SEGÚN USO DOMÉSTICO</i> .....	33
4.4.1. <i>Heterogeneidad entre estructuras de una vivienda</i> .....	33
4.4.2. <i>Heterogeneidad según uso de los ambientes domiciliarios</i> .....	34
4.5. <i>VARIACIÓN DE LA PREVALENCIA ENTRE ESTADIOS DE T. INFESTANS</i> .....	35
4.6. <i>PREVALENCIA DEL PARÁSITO SEGÚN LOS DTUS</i> .....	38
4.7. <i>SIMULACIONES DE ESTRATEGIAS DE MUESTREO DE TRIATOMINOS EN EL CAMPO</i> .....	39
4.7.1. <i>Muestreo aleatorio de los insectos</i> .....	39
4.7.1.1. <i>Muestreos aleatorios en la comunidad La Brecha</i> .....	39
4.7.1.2. <i>Muestreos aleatorios en la comunidad Palmarito</i> .....	42
4.7.1.3. <i>Muestreos aleatorios en la comunidad Lagar Pampa</i> .....	44
4.7.1.4. <i>Muestreos aleatorios en la comunidad Eje Pampa</i> .....	46
4.7.2. <i>Muestreo estratificado por viviendas</i> .....	48
4.7.2.1. <i>Muestreos estratificados en la comunidad de La Brecha</i> .....	48
4.7.2.2. <i>Muestreos estratificados en la comunidad de Palmarito</i> .....	52
4.7.2.3. <i>Muestreos estratificados en la comunidad de Lagar Pampa</i> .....	53
4.7.2.4. <i>Muestreos estratificados en la comunidad de Eje Pampa</i> .....	55
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>67</b>
ANEXOS 1 .....	73
ANEXO 2.....	74

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Estadios de desarrollo de <i>T. infestans</i> .....	7
Figura 2. Ciclo de desarrollo de <i>T. cruzi</i> .....	8
Figura 3. Signo de Romañá que indica que el parásito ha ingresado por la conjuntiva ocular.....	9
Figura 4. Área de dispersión de <i>T. infestans</i> en el territorio boliviano .....	10
Figura 5. Ubicación de las cuatro comunidades de estudio. ....	19
Figura 6. Viviendas características de la región del Chaco y los Valles.....	20
Figura 7. Fuentes de alimentación de triatominos .....	21
Figura 8. Identificación de <i>T. cruzi</i> mediante visualización de la corrida electroforética.....	24
Figura 9. Clasificación de las poblaciones de <i>T. infestans</i> según la espacialidad geográfica.....	26
Figura 10. Comparación de prevalencias de infección entre estadios en las cuatro comunidades en estudio .....	37
Figura 11. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para La Brecha .....	40

Figura 12. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en La Brecha .....	42
Figura 13. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para La Brecha.....	50
Figura 14. Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de La Brecha.....	51
Figura 15. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para Palmarito .....	74
Figura 16. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en Palmarito.....	75
Figura 17. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para Lagar Pampa.....	76
Figura 18. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en Lagar Pampa.....	77
Figura 19. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para Eje Pampa.....	78
Figura 20. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en Eje Pampa.....	79
Figura 21. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para Palmarito .....	80

Figura 22. Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Palmarito .....	81
Figura 23. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para Lagar Pampa .....	82
Figura 24. Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Lagar Pampa .....	83
Figura 25. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para Eje Pampa .....	84
Figura 26. Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Eje Pampa .....	85



# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1: Indicadores entomológicos para el control de la enfermedad de Chagas .....	2
Tabla 2: Características en capacidad vectorial de <i>T. infestans</i> .....	6
Tabla 3: Sitios de colecta de las poblaciones de <i>T. infestans</i> . .....	17
Tabla 4: Identificación de los DTU según el tamaño del amplicón del ADN de <i>T. cruzi</i> . .....	22
Tabla 5: Cebadores de la PCR-multiplex para la identificación de <i>T. cruzi</i> en <i>T.</i> <i>infestans</i> y caracterización de los linajes. ....	23
Tabla 6: Viviendas estudiadas por comunidad.....	29
Tabla 7: Macro poblaciones de <i>T. infestans</i> bajo estudio .....	30
Tabla 8: Prevalencias de infección de <i>T. infestans</i> en las cuatro comunidades en estudio. ....	31
Tabla 9: Prevalencias de infección en viviendas de cada comunidad.....	32
Tabla 10: Comparación de las prevalencia de infección entre ambientes domiciliarios.....	34
Tabla 11: Comparación en las prevalencias de infección entre estructuras con diferentes usos.....	35

Tabla 12: Prevalencias de infección por <i>T. cruzi</i> (en %) en diferentes estadios de <i>T. infestans</i> .....	36
Tabla 13: Proporción de los DTUs de <i>T. cruzi</i> (% de triatomíneos infectados por comunidad).....	38
Tabla 14: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en La Brecha .....	41
Tabla 15: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en Palmarito .....	43
Tabla 16: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en Lagar Pampa .....	44
Tabla 17: Probabilidades de obtener un falso negativo según simulación de muestreo. ....	46
Tabla 18: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en Eje Pampa .....	47
Tabla 19: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en La Brecha .....	49
Tabla 20. Probabilidades de obtener un falso negativo según simulación de muestreo estratificado .....	52
Tabla 21: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de la comunidad Palmarito .....	53

Tabla 22: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de la comunidad Lagar Pampa.....	54
Tabla 23: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Eje Pampa .....	56

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

BID: Banco Interamericano de desarrollo

DTU: Discrete Typing Units (Unidades Discretas de Tipificación), clasificación de clones de *T. cruzi* (TcI a TcVI) (Zingales *et al.* 2009)

INCOSUR-Chagas: Iniciativa de los países del Cono Sur para la eliminación del *Triatoma infestans* y Control de la Transmisión Transfusional del *Trypanosoma cruzi*

INLASA: Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (La Paz, Bolivia)

IRD: Institut de Recherche pour le Développement (Francia)

N<sub>i</sub> Estadio de desarrollo de ninfas de *T. infestans*. (  $i= 1$  a 5)

OMS: Organización Mundial de la Salud (WHO en inglés)

PAHO: Organización Panamericana de la Salud

PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PNCCH: Programa Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas

TAE: Buffer de corrida

TI: Tasa de ingestión

# RESUMEN

---

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, cuyo principal vector en Bolivia es *Triatoma infestans*, objetivo del control vectorial del Programa Nacional de Chagas. Para verificar la efectividad de las estrategias de control y delimitación de zonas de riesgo, se cuenta con indicadores entomológicos, uno de ellos es la *prevalencia de infección* por *T. cruzi* en los vectores. Sin embargo, no existe por el momento una estrategia de muestreo capaz de definir correctamente este índice al nivel de una comunidad, además existen factores de variación en el cálculo de este índice, pero son raramente tomados en cuenta porque no son muy bien conocidos. El objetivo del presente trabajo es analizar algunos factores de variación en la estimación de la prevalencia de infección e investigar varias estrategias de muestreo (aleatorio, estratificado, número de insectos a coleccionar) para minimizar los errores de estimación. Entre los factores de variación, se estudiaron factores espaciales como los lugares de captura de los insectos (dormitorios, almacenes, gallineros etc.), y factores temporales como el estado de desarrollo de los insectos.

Se trabajó con insectos de comunidades del Chaco boliviano de la Provincia Cordillera en el departamento de Santa Cruz (La Brecha y Palmarito) y los Valles Interandinos Secos en la Provincia Campero en Cochabamba (Lagar Pampa y Eje Pampa), en los cuales se identificó la presencia de *T. cruzi* y sus DTUs (Unidades discretas de tipificación), por el método de PCR-multiplex. Se observó que la prevalencia de infección varía a nivel temporal y geográfico-espacial, debido a la dinámica poblacional inter-relacionada de los vectores y de los mamíferos que son las fuentes de alimentación para el insecto. Las simulaciones de muestreo demostraron que una captura aleatoria de por lo menos 200 insectos, de diversos estadios, en las viviendas infestadas de una comunidad, es una forma de muestreo que da una estimación confiable de la prevalencia de infección. Sin embargo, desde un enfoque de importancia epidemiológica, se recomienda trabajar solamente al nivel de los dormitorios, y no en todas las estructuras de una vivienda (cocina, almacén, troja, corral, etc.).

# 1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

---

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una antrozo-zoonosis endémica de las Américas. Es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y afecta a millones de personas (WHO 2007). En el 80% de los casos humanos, el parásito es transmitido por un insecto Hemíptero de la familia Reduviidae, siendo en Bolivia el principal vector *Triatoma infestans* (Schofield 1985), el cual desarrolla su ciclo de vida dentro de las viviendas, en una estrecha relación con el humano. Debido a la importancia vectorial intradomiciliar de este insecto, el control de la enfermedad de Chagas en Bolivia se basa principalmente en el control vectorial, rociando las casas y sus alrededores con insecticidas residuales de la familia piretroides. Medir el impacto del control vectorial sobre la transmisión del parásito es de suma importancia, para tal objeto la PAHO/WHO (OMS) recomienda indicadores de evaluación a nivel entomológico, serológico y clínico, los dos últimos se realizan principalmente en niños menores de cinco años (WHO 1991). Los factores entomológicos definidos por la OMS se presentan en la Tabla 1.

El presente trabajo contempla el indicador entomológico denominado *índice de infestación natural* o prevalencia de infección en *T. infestans*.

Este índice se lo define como la prevalencia de infección por *T. cruzi* en una población de vectores (OPS 1987; WHO 1991). Este indicador se emplea también para la estratificación en zonas de riesgo de la enfermedad, y así poder definir estrategias de control vectorial para cada área geográfica. Actualmente este indicador entomológico es manejado por el Programa Nacional de Chagas (PNCH), como uno de los indicadores de riesgo vectorial de la enfermedad. Sin embargo, el cálculo de este índice no está todavía optimizado debido a que el

PNCH no define ningún tamaño mínimo de muestra y tampoco una forma de muestreo óptimo (esfuerzo de muestreo), afectando así la precisión de los resultados.

En el presente trabajo se analizan algunos de los factores relacionados con la metodología de muestreo y el esfuerzo del mismo (tamaño de muestra), y cómo estos pueden afectar a la determinación de la prevalencia de infección. En particular, se analizan los efectos de la edad de los insectos, del lugar de captura dentro de la comunidad de estudio, y del número de insectos analizados sobre la estimación de la prevalencia de infección al nivel de una comunidad.

Tabla 1: Indicadores entomológicos para el control de la enfermedad de Chagas. *Adaptado de (WHO 1991).*

Indicador entomológico	Determinación
Índice de infestación	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de casas infestadas por triatominos}}{\text{N}^\circ \text{ de casas examinadas}} \times 100$
Índice de densidad	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de triatominos capturados}}{\text{N}^\circ \text{ de casas examinadas}} \times 100$
Índice de hacinación	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de triatominos capturados}}{\text{N}^\circ \text{ de casas con triatominos}} \times 100$
Índice de dispersión	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de localidades infestadas con triatominos}}{\text{N}^\circ \text{ de localidades examinadas}} \times 100$
Índice de colonización	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de casas con ninfas de triatominos}}{\text{N}^\circ \text{ de casas positivas para triatominos}} \times 100$
Índice de infestación natural (Prevalencia de infección)	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de triatominos con } T. \text{ cruzi}}{\text{N}^\circ \text{ de triatominos examinados}} \times 100$

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo general

Evaluar el impacto de los factores de heterogeneidad a nivel espacial (geográfico) y temporal (desarrollo ninfal) sobre la determinación de la prevalencia de infección en *T. infestans* por *T. cruzi*.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar el parásito *T. cruzi* en ninfas y adultos (hembras y machos) de *T. infestans*.
- Comparar los patrones de prevalencia a distintos niveles de jerarquización geográfica:
  - A nivel macro-geográfico en cuatro comunidades del Chaco y de los Valles secos.
  - A nivel micro-geográfico entre viviendas y entre estructuras de viviendas de diferentes usos domésticos.
- Analizar las tendencias de variación de la prevalencia según la estructura etaria de *T. infestans*.
- Comparar la variación en las prevalencias de infección según diferentes tamaños de muestra.
- Plantear las condiciones de muestreo óptimas para calcular una prevalencia de infección en *T. infestans*.



## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una parasitosis endémica de las Américas, particularmente de América Central y del Sur (WHO 2002). Es causada por el flagelado *Trypanosoma cruzi*. En esta infección parasitaria, sistémica y crónica, el 30% de los infectados desarrolla graves cardiopatías y/o mega formaciones digestivas (WHO 2007). Se ha estimado que alrededor de 7 a 8 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* en todo el mundo, pero principalmente en países de Latino América (WHO 2013) y 75–90 millones están expuestas a la infección (Rodríguez & Pinto 2009). El ciclo de *T. cruzi* involucra un amplio rango de hospederos mamíferos e insectos vectores del orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (Lent 1948). La transmisión del parásito se da por diferentes vías como la sanguínea o placentaria, pero la transmisión vectorial es significativa, siendo responsable de más del 80% de los casos humanos (WHO 2007; WHO 2011).

En Bolivia cerca de dos tercios del territorio presentan altas tasas de prevalencia y morbi-mortalidad (WHO 2011). Es así que la enfermedad de Chagas representa un serio problema de salud pública tanto por su magnitud, trascendencia, impacto y difícil control. En el país las acciones contra la enfermedad de Chagas surgen desde los años ochenta, con diversas iniciativas a nivel regional, una de la más destacadas fue la “Iniciativa de los países del Cono Sur para la eliminación del *Triatoma infestans* y Control de la Transmisión Transfusional del *Trypanosoma cruzi*” (INCOSUR-Chagas) creada en 1991. A partir de 1999 se inicia el marco del Programa Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas (PNCCH), y en el 2000, sobre la base del crédito del Banco Interamericano de desarrollo (BID) se extienden las actividades del PNCCH a todo el territorio endémico de Bolivia y se desarrolla el PNCCH con sede en La Paz. El PNCCH centra sus actividades en cinco componentes:

- *Control vectorial*: con aplicación de insecticidas de acción remanente.
- *Investigación y vigilancia entomológica*: con capacitación del recurso humano, para mantener los índices de infestación por debajo del 3%.
- *Diagnóstico y tratamiento de Chagas crónico reciente infantil*: con el diagnóstico y tratamiento en menores de 15 años.
- *Chagas congénito*: mediante el diagnóstico y seguimiento de niños nacidos en los seis departamentos endémicos de Bolivia (Cochabamba, Chuquisaca, La Paz, Potosí, Santa Cruz y Tarija).
- *Información, educación y capacitación (IEC)*: con capacitación comunitaria dentro el área, en base a la vigilancia e implementación de hábitos saludables en los pobladores.

## **2.2. TRIATOMA INFESTANS, PRINCIPAL VECTOR EN BOLIVIA**

### **2.2.1. Bio-ecología de *T. infestans***

Para que un triatomino tenga importancia epidemiológica en la transmisión de *T. cruzi* debe cumplir ciertas características biológicas en relación con su entorno, estas son: adaptación al domicilio, antropofilia, susceptibilidad a la infección y capacidad de transmitir *T. cruzi*. En conjunto estas características facilitan la transmisión de *T. cruzi* al ser humano y definen la capacidad vectorial del triatomino (Dujardin *et al.* 2000). Aunque en Bolivia hay vectores candidatos a domiciliarse como *Triatoma sordida* (Noireau & Rojas 2007), *T. infestans* ha sido verificado como el principal vector doméstico de la enfermedad de Chagas (Rojas *et al.* 2007), esto por sus características de capacidad vectorial (Noireau & Rojas 2007) (Tabla 2), y por esto es el principal blanco de los programas de control vectorial (Gutierrez 2004).

*Triatoma infestans* es un insecto estrictamente hematófago muy bien adaptado al ambiente doméstico, donde encuentra abundantes refugios principalmente en viviendas de construcción precaria. De esta forma este insecto mantiene una estrecha relación con el humano, el cual constituye una de sus fuentes alimenticias, entre una amplia gama de vertebrados mamíferos y también aves (estas últimas no son hospederas de *T. cruzi*). *T. infestans* tiene fototaxia negativa, por lo que evita la luz, y durante la noche sale de sus refugios en busca de alimento (Schofield 1979).

Tabla 2: Características en capacidad vectorial de *T. infestans*. Adaptado de (Noireau & Rojas 2007)

Característica en capacidad vectorial	Valoración	Descripción
Nivel de domesticidad	Elevado	El desarrollo completo del insecto se realiza dentro la vivienda
Tasa de reproducción	Alta	forman colonias domésticas grandes
Antropofilia	Muy común	El humano como principal fuente de alimento
Infección por <i>T. cruzi</i>	Muy común	
Tasa de metaciclogénesis	Alta	Tasa de transformación de epimastigotes a tripanomastigotes metacíclicos
Tiempo de la primera deyección	Corto	Deja sus heces infectadas sobre la piel del huésped inmediatamente luego de alimentarse sobre este

Desde el punto de vista ontogénico, *T. infestans* posee tres fases de desarrollo: huevo, cinco estadios inmaduros (ninfas), y la forma alada adulta (Bar *et al.* 1994) (Figura 1).

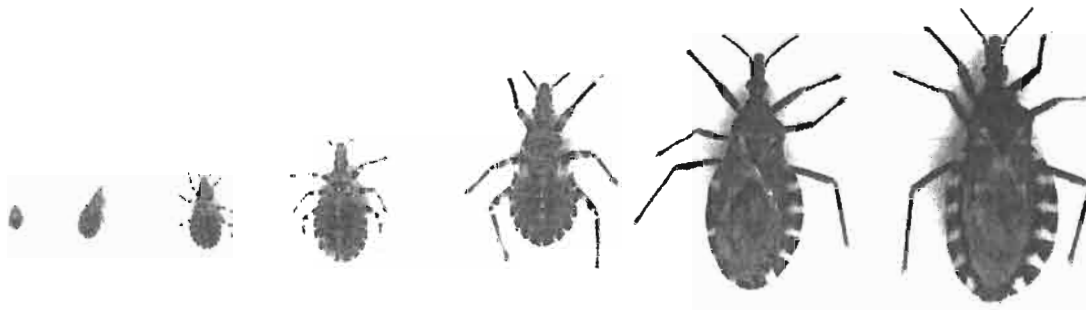
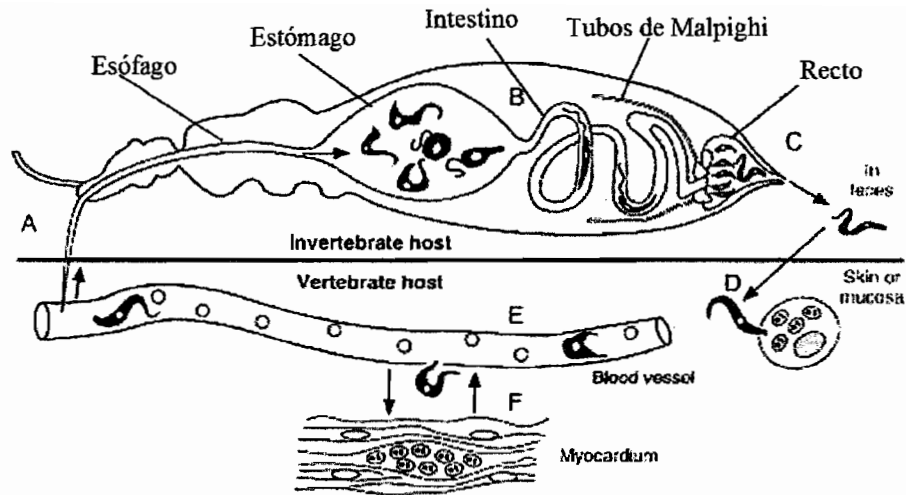


Figura 1. Estadios de desarrollo de *T. infestans*. Se observa de izquierda a derecha en el respectivo orden: huevos, los estadios ninfales de N1 a N5 y los estados adultos (macho y hembra).

En climas cálidos y con poca variabilidad térmica, *T. infestans* tiene hasta dos generaciones anuales con igual longitud temporal. En lugares con marcada estacionalidad, como es el caso del Chaco árido y semiárido, donde los veranos son muy calurosos y los inviernos muy fríos (con frecuentes heladas), pueden ocurrir dos generaciones anuales pero de diferente longitud temporal, una ocurre en cuatro meses (octubre-enero) y la otra en los restantes ocho meses (febrero-septiembre) (Gorla & Schofield 1989). Durante los meses más fríos la reproducción se interrumpe y el desarrollo de las ninfas se prolonga.

### 2.2.2. Ciclo de transmisión vectorial y capacidad vectorial de *T. infestans*

El ciclo de transmisión vectorial implica tanto al hospedero (vertebrado) como el vector (insecto), en los cuales *T. cruzi* cumple su ciclo de desarrollo (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de desarrollo de *T. cruzi*. **A.** El parásito (tripomastigote sanguíneo) ingresa al insecto cuando este ingiere sangre infectada, **B.** a lo largo de su tracto digestivo sufre una serie de transformaciones (esferomastigote, epimastigote), **C.** resultando en la expulsión de tripomastigotes metacíclicos en las deyecciones, **D.** que al entrar en contacto con la mucosa del vertebrado, ingresan a las células para pasar a su forma multiplicativa (amastigote), **E.** los cuales son liberados al torrente sanguíneo como tripomastigotes sanguíneos, **F.** y pueden invadir otros órganos para multiplicarse.

El mecanismo normal de infección del insecto vector se da mediante la picadura e ingestión de sangre de un hospedero infectado. Por este medio los tripanomastigotes sanguíneos ingresan al insecto, e inmediatamente se diferencian en formas redondeadas (esferomastigotes) o directamente pasan a su forma multiplicativa epimastigote, estos se multiplican en el intestino del insecto (Dias 1934; Mshelbwala & Ormerod 1973). En la parte rectal del insecto, los epimastigotes se adhieren a las glándulas rectales donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (infectivos para los mamíferos) y son liberados por las deyecciones del vector (Kollien *et al.* 1998). Los tripomastigotes metacíclicos liberados en las deyecciones, entran en contacto con la lesión de la picadura o cualquier mucosa en el hospedero. Por ejemplo, una forma frecuente de evidenciar esto en seres humanos, es por el signo de Romaña, que indica que el parásito ha ingresado por la conjuntiva ocular (Romaña 1935) (Figura 3).



**Figura 3. Signo de Romaña que indica que el parásito ha ingresado por la conjuntiva ocular.**

Al penetrar activamente en gran número, los parásitos son fagocitados por células de defensa, dentro de las cuales se transforma a amastigotes que se multiplican activamente, esta fase aguda dura cinco días y el parásito puede encontrarse en el interior de las fibras musculares. Estos amastigotes son liberados al torrente sanguíneo en forma de tripomastigotes sanguíneos, donde pasan algunos días, y pueden invadir diferentes órganos, y dentro de las células retículo-endoteliales, se transforman nuevamente en amastigotes, continuando así el ciclo de infección en el mamífero (Brenner & Alvarenga 1975).

### **2.3. MANEJO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN *T. INFESTANS* EN EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

En Bolivia, el área de dispersión de *T. infestans* cubre aproximadamente el 60% del territorio, en zonas geográficas comprendidas entre los 300 a 3000 m.s.n.m., ocupando casi

toda la superficie territorial de los departamentos de Tarija, Chuquisaca, y parcialmente Cochabamba, Santa Cruz, Potosí y La Paz (WHO 2011) (Figura 4).

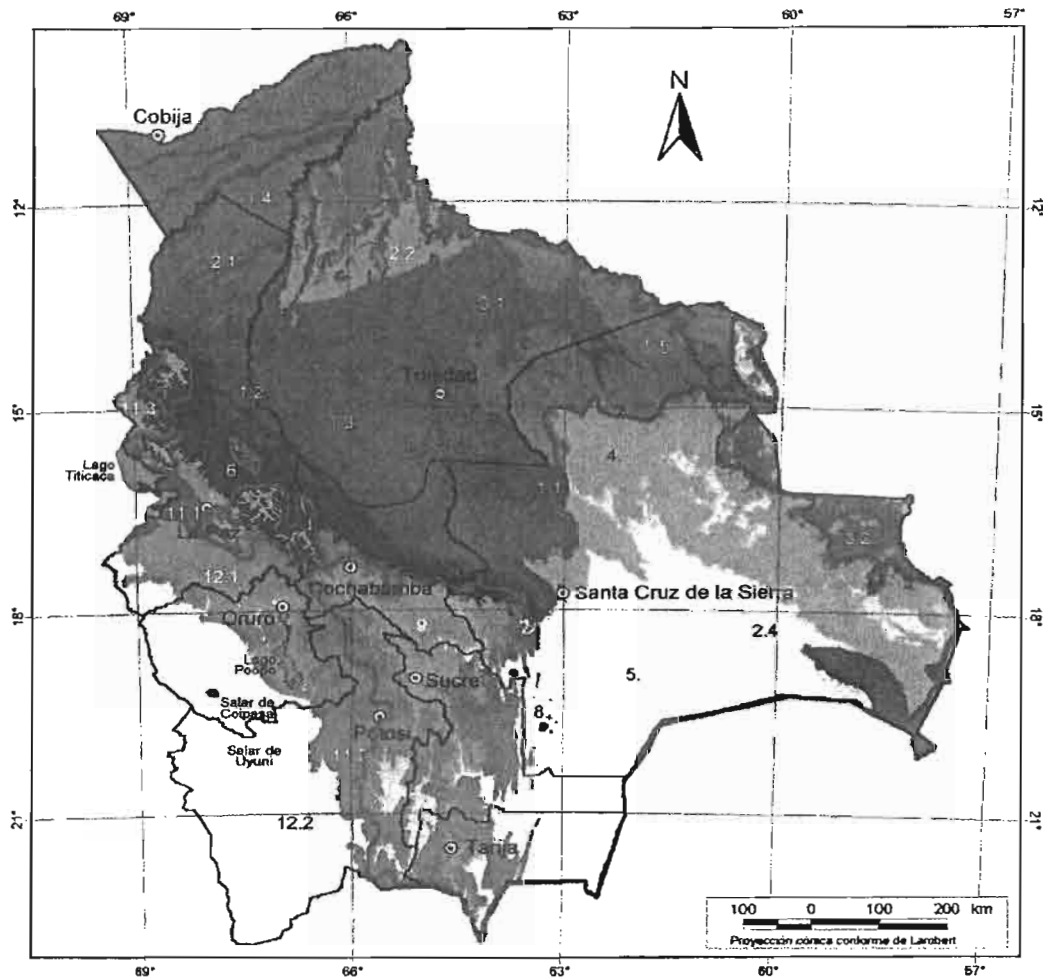


Figura 4. Área de dispersión de *T. infestans* en el territorio boliviano. (Modificado de Ibish. 2009)

El año 2000, el Gobierno de Bolivia con crédito del Banco Interamericano de Desarrollo (BID) y el apoyo técnico de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), estructura el Programa Nacional de Chagas (WHO 2011). Actualmente este programa maneja acciones para el control de la transmisión que incluyen exámenes preventivos de pacientes y el tratamiento gratuito, y el control vectorial. El control vectorial se basa

esencialmente en campañas de fumigación con insecticidas de efecto residual de tipo piretroide en los domicilios y peri-domicilios de las viviendas infestadas, con el objetivo de reducir las densidades poblacionales del vector en las comunidades endémicas (Gutierrez 2004). Países como Brasil, Chile y Uruguay han tenido éxito en programas de eliminación de este vector, a diferencia de Bolivia donde hay dificultades para aplicar y mantener estos programas (Catalá *et al.* 2007).

La factibilidad de los programas de control vectorial se sostiene por peculiaridades biológicas de comportamiento de este vector, que lo hacen altamente susceptible: 1) tiene pequeña capacidad de dispersión activa, o sea, una gran estabilidad de las poblaciones domiciliadas; 2) lenta reposición poblacional (en términos promedio, nuevas generaciones se desarrollan en aproximadamente un año); y, además, 3) todos los estadios evolutivos están simultáneamente presentes en el mismo ecotopo (Schofield 1979).

Es necesario el monitoreo sistemático de los efectos del control vectorial sobre la transmisión de la enfermedad. Para este monitoreo la OMS lista una serie de indicadores que son sensibles para cuantificar la enfermedad y su riesgo (WHO 2007), uno de los cuales es a través de la determinación del *índice T/T*, expresado también *como prevalencia de infección* en los vectores. Es un indicador entomológico que se calcula por comunidades para verificar la interrupción de la transmisión vectorial (Salvatella 1995). La prevalencia como indicador entomológico, también es empleado para la estratificación de un área determinada, según diferentes niveles de riesgo de transmisión, y así poder aplicar estrategias de control diferenciadas para cada caso (WHO 2002).



## **2.4. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN EL CÁLCULO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN *T. INFESTANS***

Diversos estudios que estiman la prevalencia de infección en las poblaciones de *T. infestans*, revelan que varía según una serie de factores, que pueden ser clasificados en dos grandes categorías: biológicos (referentes al vector) y ambientales.

### **2.4.1. Factores biológicos del vector**

#### **2.4.1.1. Densidades de *T. infestans* y frecuencia de alimentación**

Al ser *T. infestans* hematófago obligatorio, su ciclo de vida y la dinámica poblacional depende de manera crítica de la interacción con los hospederos vertebrados (Schofield 1979). De manera general el tamaño poblacional de triatominos en el intradomicilio está relacionado con el número de hospederos disponibles, y el estatus nutricional de la población depende del número de insectos por hospedador (Gürtler *et al.* 2009), además se ha demostrado que la cantidad media de sangre ingerida es inversamente proporcional a la densidad de insectos (Schofield 1980).

Es así que, un aumento en la densidad de triatominos induce una mayor percepción de las picaduras sufridas por el hospedero, ocasionando interrupciones frecuentes durante el proceso de alimentación, lo cual disminuye la cantidad media de sangre ingerida, al disminuir la ingesta de sangre se prolonga el periodo de desarrollo ninfal, reduciendo la fecundidad de hembras y promoviendo la dispersión de los adultos (Schofield 1985). Además los insectos deberán aumentar la frecuencia de picaduras para suplir la insuficiencia alimentaria, con lo que se tiene mayor probabilidad de que se infecten en un periodo de tiempo más corto.

#### **2.4.1.2. Proporción de mamíferos infectados y preferencias tróficas**

*Triatoma infestans* es considerado como un oportunista en cuanto a sus fuentes de alimentación, por lo que no se puede hablar de preferencias tróficas como tal (WHO 1991), de modo que la “elección” de la fuente de alimento, se rige por la accesibilidad al alimento (presencia, abundancia, movilidad y cercanía del hospedero) (Vázquez *et al.* 1999) y por la dinámica poblacional del insecto (denso-dependencia). La probabilidad de infección en los triatominos, está sujeta a la proporción de mamíferos infectados disponibles, siendo uno de los factores que influyen la prevalencia de infección y retroalimenta el ciclo de transmisión vectorial (Gürtler *et al.* 1996; Gürtler *et al.* 1998a; Vázquez, *et al.* 1999). Cabe mencionar, que las aves no son hospederos del parásito (Minter-Goedbloed & Croon 1981), pero la presencia de las mismas tiene efecto sobre el aumento en la densidad poblacional del vector (al ser una buena fuente de alimento) (Gürtler, *et al.* 2009), siendo un factor de riesgo de infestación (Cécere *et al.* 1997) y posible infección.

#### **2.4.1.3. Tasa de ingestión (TI) según edad del vector**

Otro de los parámetros que influyen en la prevalencia de infección, está en relación con el comportamiento de alimentación, donde el principal parámetro es la tasa de ingestión (TI), que es definida como la cantidad de sangre ingerida por unidad de tiempo (mg de sangre / min.), que varía según la especie de vector, y considerablemente entre estadios ninfales de la misma especie (Catalá, *et al.* 2007; Cécere, *et al.* 1997). Por ejemplo para *Triatoma brasiliensis*, el primer estadio tiene una TI de 0.4 mg/min, mientras que para el quinto estadio es de 10.6 mg/min (Guarneri *et al.* 2003). Una mayor tasa de ingestión, derivaría en una mayor probabilidad de infectarse con *T. cruzi*, en relación con una mayor densidad de parásitos ingeridos junto con la sangre y la frecuencia de alimentación (Gürtler, *et al.* 1996).

#### **2.4.1.4. Factores fisiológicos**

La interacción de *T. cruzi* con el triatomino es mediada por factores provenientes tanto del insecto vector como del parásito (García E. & Azambuja 1991) siendo actualmente conocido que el desarrollo del parásito en el vector depende de la cepa del mismo, como del origen geográfico del insecto (Dumonteil *et al.* 2012; Perlowagora-Szumlewicz & Carballo-Moreira 1995; Vallejo *et al.* 2012). En este sentido, se viene realizando estudios sobre los factores que determinan la interacción vector-parásito; es así que se ha observado, que la densidad de parásitos varía a lo largo del tracto digestivo del insecto, por la influencia de diferentes procesos digestivos (Cortez 2000; García E. & Azambuja 1991; Gonzales & Garcia 1992), esto también es corroborado por el trabajo de Vallejo, *et al.* (2012), en el que verifica la presencia de factores tripanolíticos contra *T. cruzi* II, V y VI además de *T. rangeli*, en la hemolinfa y el extracto estomacal de los triatominos *R. prolixus* y *R. robustus* (Ursic-Bedoya & Lowenberger 2007).

De esta forma, el éxito de la metaciclologénesis y la prevalencia de una u otra cepa de *T. cruzi*, podría depender de éstas interacciones interespecíficas que se deben tomar en cuenta como parámetros que influyen la estimación de la prevalencia de infección en los vectores, a una escala más detallada.

#### **2.4.2. Factores ambientales**

Al ser *T. infestans* un insecto poiquilotermo su desarrollo morfológico y metabólico dependerán de las condiciones físicas del medio ambiente, específicamente de la temperatura y humedad. Trabajos realizados en épocas diferentes del año, reportan diferencias significativas en la prevalencia de diferentes estadios de *T. infestans* (Giojalas *et al.* 1990; Gürtler *et al.* 1998b), estas diferencias se deben a que los factores ambientales regulan el metabolismo y la frecuencia de alimentación del insecto, esto especialmente relacionado con la época

reproductiva de *T. infestans*, por lo que, durante las épocas húmedas y cálidas los insectos se alimentarán con mayor frecuencia que en épocas secas y frías (López *et al.* 1999), con lo que aumenta el riesgo de que las poblaciones del vector se infecten, esto dependiendo de la presencia y accesibilidad a fuentes infectadas con *T. cruzi*.

## **2.5. CALCULO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN EL VECTOR**

La estimación de la prevalencia de infección se realiza mediante el análisis de los triatomos para identificar qué proporción está infectada con el parásito. Esto se realiza mediante técnicas microscópicas o moleculares.

### **2.5.1. Identificación de los parásitos por microscopía**

Esta técnica es sencilla y no muy costosa, donde se analiza al microscopio la presencia de *T. cruzi* (en estado de tripomastigote metacíclico) en las deyecciones de los triatomos mediante ligera presión en su abdomen y observación de la deyección en líquido fisiológico debajo un microscopio. Este método es fácil de realizar tanto en laboratorio como en el campo, pero tiene baja sensibilidad en insectos infectados con baja densidad de parásitos. Además, las muestras deben ser frescas, y cuando se tiene gran cantidad de insectos colectados, el análisis inmediato se dificulta. Por otro lado, al trasladar los insectos al laboratorio después de varios días de colecta, se corre el riesgo de que algunos mueran y lleguen en mal estado, impidiendo la determinación de la prevalencia de infección por la técnica microscópica.

### **2.5.2. Identificación de los parásitos por técnicas de biología molecular**

Para aumentar la sensibilidad en la detección del parásito se han desarrollado una serie de técnicas moleculares, con las que se puede identificar y clasificar a *T. cruzi* a partir de

muestras del contenido intestinal de los insectos, incluso si estos llevan muertos un periodo de tiempo largo, conservados debidamente (en etanol y a bajas temperaturas). Además estas técnicas permiten la clasificación de los diferentes linajes de parásitos presentes en una población.

Para la tipificación de *T. cruzi* se han empleado diferentes métodos en los que se requiere por ejemplo extractos del parásito para la caracterización de isoenzimas con la técnica de MLEE (Electroforesis de enzimas multilocus); el análisis específico de los patrones de diferentes enzimas (zimodemas) por electroforesis denominado RFLP (polimorfismo para la longitud de fragmentos de restricción), que se realiza con el ADN del kinetoplasto (kDNA) (Miles *et al.* 1978), estos métodos requieren el cultivo del parásito. En cuanto al ADN nuclear, hay varias herramientas molecular disponibles para la caracterización de *T. cruzi*, una de ellas es la tipificación por RAPS (ADN polimórfico amplificado al azar) que usa cebadores cortos de secuencias al azar, los cuales pueden amplificar fragmentos desconocidos del ADN formando múltiples patrones de bandas que pueden ser específicas para un linaje (Brisse *et al.* 2000). Otra de las técnicas que emplea el ADN nuclear del parásito es la PCR-multiplex, este método molecular detecta la presencia del parásito usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen mini-exón (ME), presente en el genoma nuclear del parásito, en cerca de 200 copias dispuestas en secuencias repetidas en tándem, que consta de tres regiones distintas: el exón, el intrón y la región intergénica. El exón es una secuencia de 39 pares de bases, altamente conservada entre el orden *Kinetoplastida*; el intrón es moderadamente conservado entre el mismo género y la región intergénica o espaciadora (NTS-ME) es muy variable entre especies y linajes del parásito y es la que se amplifica por la PCR-multiplex (Fernandes *et al.* 2003).

### 3. METODOLOGÍA

---

#### 3.1. SITIO DE ESTUDIO

Las poblaciones de *T. infestans* han sido obtenidas de cuatro comunidades: Palmarito y La Brecha pertenecientes a la Provincia Cordillera del departamento de Santa Cruz; Eje Pampa y Lagar Pampa, pertenecientes a la Provincia Campero del departamento de Cochabamba (Tabla 3, Figura 5).

Tabla 3: Sitios de colecta de las poblaciones de *T. infestans*.

	Palmarito	La Brecha	Eje Pampa	Lagar Pampa
Departamento	Santa Cruz	Santa Cruz	Cochabamba	Cochabamba
Provincia	Cordillera	Cordillera	Campero	Campero
Municipio	Gutiérrez	Charagua	Aiquile	Aiquile
Latitud	S: 19.48752	S:19.50139	S:18.52572	S:18.45512
Longitud	W: 63.45803	W:62.56703	W:65.17261	W:64.99045
Altitud (m.s.n.m.)	938	414	1687	1575

Tanto Palmarito como La Brecha pertenecen a la región del Chaco boliviano, pero en diferentes eco-regiones: Palmarito pertenece a la eco-región del Chaco Serrano, con altitudes que varían de 700 a 2000 m y una temperatura media anual de 26°C (0°C a 42°C). Es la porción más seca del Chaco, con una precipitación promedio anual entre 700-1000 mm entre diciembre y abril. La vegetación es propia del bosque xérico, bajo y espinoso. La Brecha pertenece a la eco-región del Gran Chaco, con altitudes que van desde los 200 a 600 m, con temperatura promedio anual de 25°C-26°C (1°C a 48°C), y precipitación media anual de 400-

900 mm. La vegetación es propia del bosque seco deciduo bajo, donde predominan las cactáceas columnares (Montes de Oca 2005).

Eje Pampa y Lagar Pampa pertenecen a la eco-región de los Bosques Secos Interandinos, propiamente los Valles cochabambinos, con altitudes entre 500-3300 m, una temperatura anual entre 7-24° C (0°C a 30°C), precipitación anual de 500-700 mm. La vegetación es propia del bosque seco deciduo, predominan los géneros de *Acacias*, *Ceiba*, *Prosopis* y *Capparis* (Montes de Oca 2005).

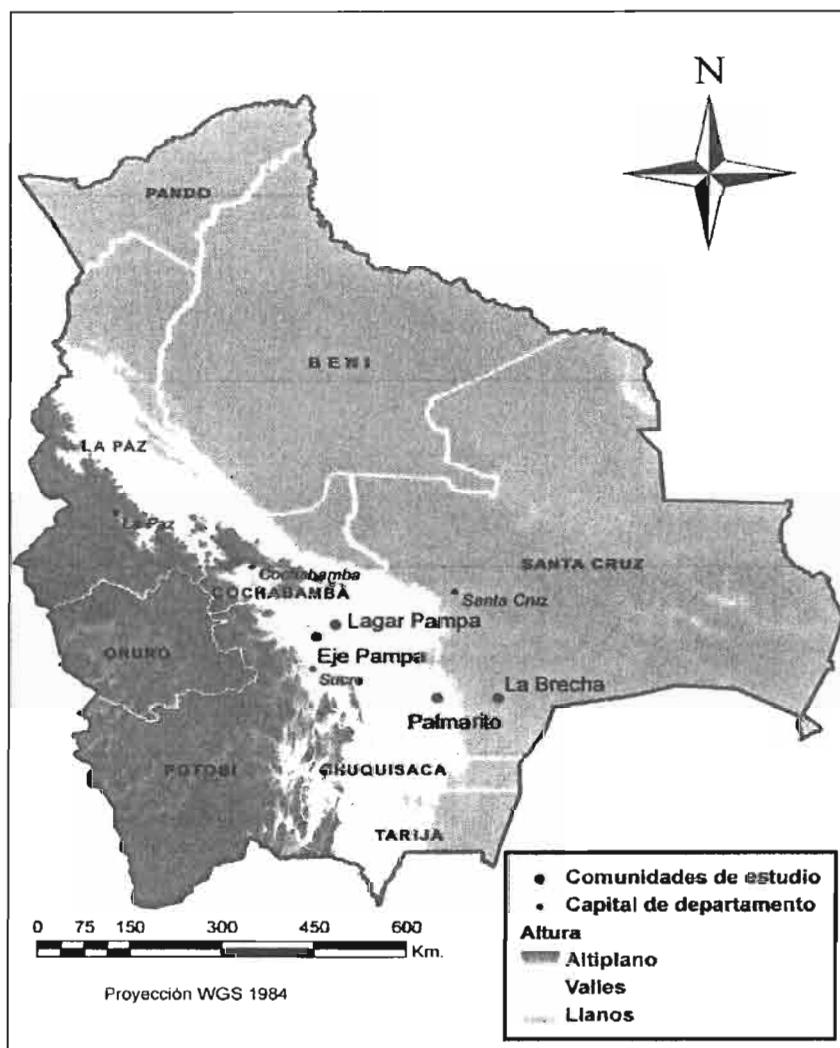


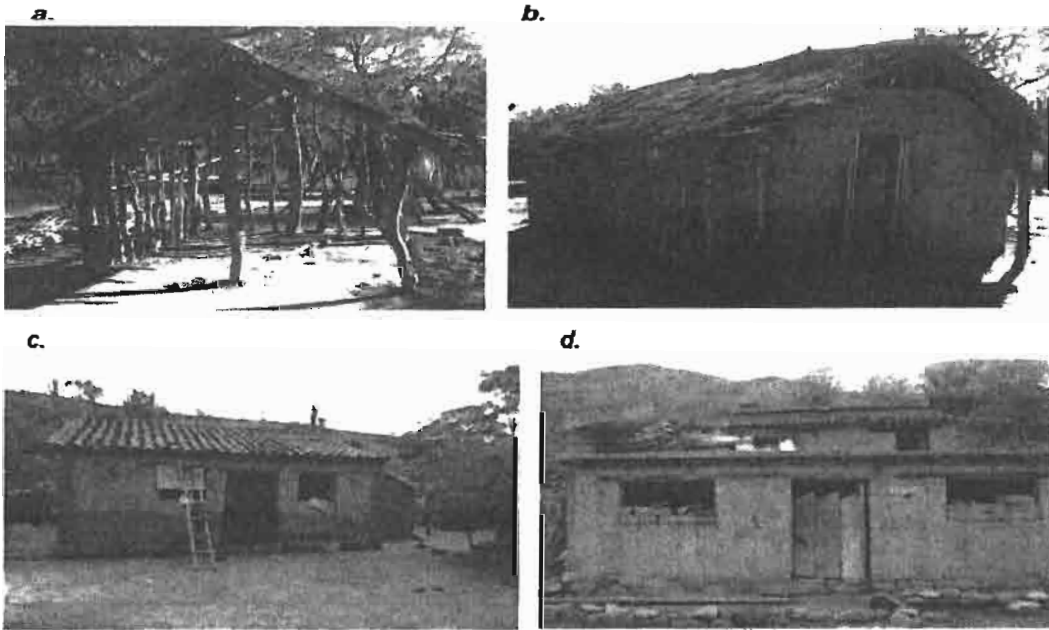
Figura 5. Ubicación de las cuatro comunidades de estudio.

Fuente: Diseño propio en ArcGIS

Cada comunidad está constituida por 40 a 90 casas. Los habitantes se dedican a la agricultura, la caza y zafra, y sus viviendas son hechas con material local. Las paredes son construidas con tabique en la región del Chaco (Figura 6 *a* y *b*) y con adobe en la región de los Valles (Figura 6 *c* y *d*). Estos materiales de construcción son muy favorables para el



establecimiento de poblaciones de *T. infestans* (WHO 1991) especialmente porque presentan grietas y espacios entre tabiques. En las comunidades se encuentran también animales domésticos como perros, gatos, cabras, chanchos, gallinas que también favorecen la presencia de los triatomínos en sus refugios (corrales, gallineros, chiqueros, etc.) o por sus hábitos de vida ( Figura 7).



**Figura 6. Viviendas características de la región del Chaco y los Valles. a y b: Viviendas del Chaco en Santa Cruz. a. casa en Palmarito; b. casa en La Brecha; c y d: viviendas de los Valles de Cochabamba: c. casa en Lagar Pampa; d. casa en Eje Pampa.**

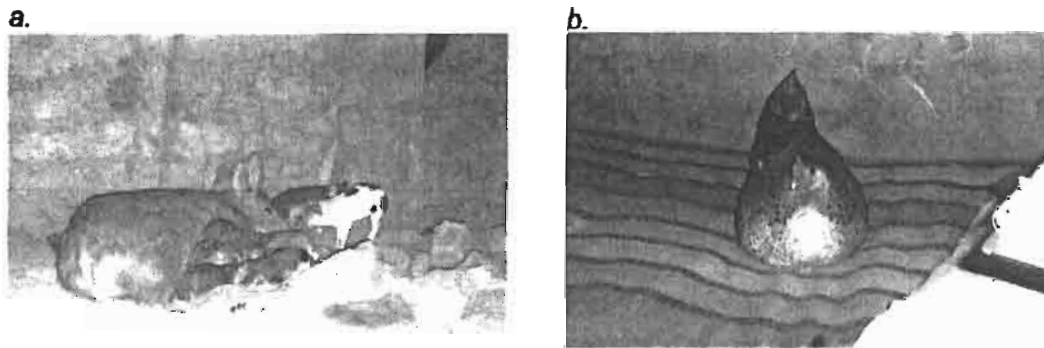


Figura 7. Fuentes de alimentación de triatominos. a. un chiquero en Palmarito. b. una gallina empollando sobre una cama

### 3.2. COLECTA DE *TRITOMA INFESTANS*

Los insectos fueron capturados según la técnica de búsqueda activa (WHO 1991) por personal capacitado del INLASA en las cuatro comunidades de estudio entre marzo y abril del 2011 en La Brecha y Palmarito, y en diciembre del 2011 en Lagar Pampa y Eje Pampa.

Cada insecto fue identificado por morfología usando claves de identificaciones estándar (Lent & Wygodzinsky 1979). Los insectos se registraron en una base de datos con las características siguientes:

- Un código individual
- La especie
- El estadio de desarrollo (N1 a N5, adulto)
- El sexo de los adultos (macho / hembra)
- La comunidad de colecta
- La vivienda de colecta
- El tipo y uso del ambiente de la vivienda donde se hizo la colecta (dormitorio, cocina, almacén, gallinero, troje, corral de animales, baño etc.)

Cada insecto se colocó en tubos individuales Eppendorf de 1.5ml con etanol al 70%. Se rotularon con el código del insecto, y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

### 3.3. DETECCIÓN DE *T. CRUZI* EN LOS INSECTOS POR PCR

La detección e identificación de *T. cruzi* en los triatominos fue realizada mediante la técnica PCR multiplex del gen mini-exón del ADN nuclear de *T. cruzi* (Fernandes *et al.* 2001), este método permite no solamente detectar la presencia del parásito y diferenciarlo de *Trypanosoma rangeli*, si no también caracterizar el parásito según su pertenencia a uno de tres grupos principales de DTU (Unidades Discretas de Tipificación, clasificación de clones de *T. cruzi*) en función al tamaño del amplicón (Fernandes, *et al.* 2001; Lewis *et al.* 2009). El fragmento de amplificación varía según el DTU del parásito entre 250 y 150 pares de bases (Tabla 4).

Tabla 4: Identificación de los DTU según el tamaño del amplicón del ADN de *T. cruzi*.

Tamaño del amplicón (pb)	DTU
150	TcIII – TcIV
200	TcI
250	TcII-TcV-TcVI

#### 3.3.1. Extracción del ADN

A los insectos de mayor tamaño (N4, N5 y adultos), se les extrajo el tubo digestivo (intestino y recto) con tijeras y pinzas quirúrgicas individuales para evitar contaminación entre individuos. Con los insectos de menor tamaño (N1, N2 y N3), en caso de no poder hacer la extracción del tubo digestivo, se cortó la parte basal del abdomen, el cual contiene la parte final del tubo digestivo y la sangre de la que se ha alimentado el insecto.

El tejido extraído se sometió al protocolo de extracción de ADN con CTAB al 2%, este protocolo fue ligeramente modificado, adecuando cantidades y tiempos debido a la consistencia y espesor de las muestras (Anexo 1).

### 3.3.2. Identificación y caracterización de *T. cruzi* por PCR

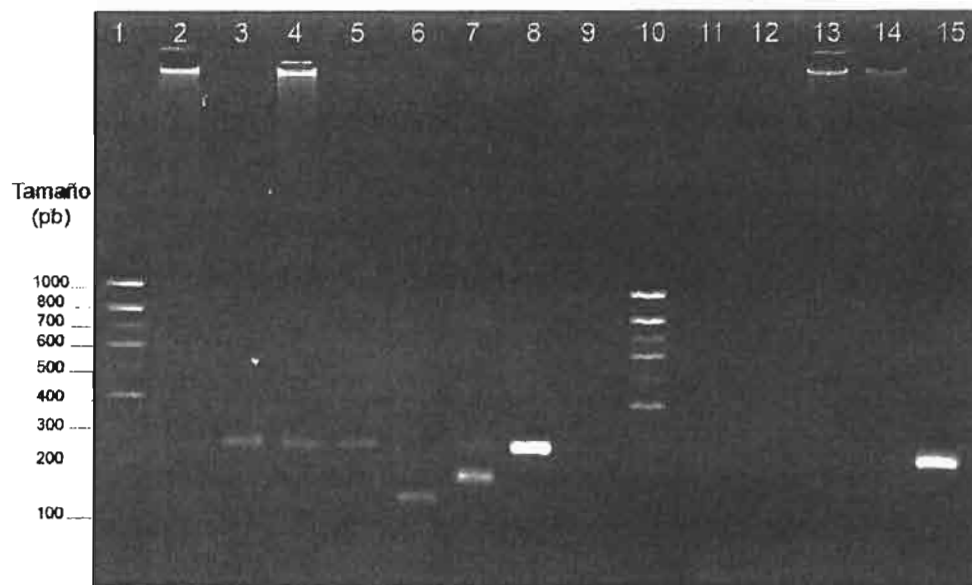
La identificación de *T. cruzi* se realizó con la PCR-multiplex (Fernandes, *et al.* 2001). Las condiciones fueron ligeramente modificadas de la manera siguiente: Un volumen de 2  $\mu$ L de ADN se sometió a amplificación por PCR-Multiplex en 23  $\mu$ L del mix de reacción que contenía: 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP's, 0,4  $\mu$ M de cada cebador (Tabla 5) y 0,03 U/ $\mu$ L de Taq DNA polimerasa (Promega). En un termociclador (Hybaid), se realizaron 35 ciclos de amplificación sobre la base del perfil siguiente: 5 minutos a 94° C, una vez; 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 53° C, 1 minuto 30 segundos a 72° C, por 35 repeticiones; y 7 minutos a 72° C, una vez.

Tabla 5. Cebadores de la PCR-multiplex (Fernandes, *et al.* 2001) para la identificación de *T. cruzi* en *T. infestans* y caracterización de los linajes.

Nombre	Secuencia	Función
TC1	5'-ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG-3'	Identificación de TcI
TC2	5'-TTGCTCGCACACTCGGCTGATCG-3'	Identificación de TcII-TCV-TcVI
Z3	5'-CCGCGWACAACCCCTMATAAAAATG-3'	Identificación de TcII-IV
TR	5'-CCTATTGTGATCCCCATCTTCG-3'	Identificación de <i>T. rangeli</i>
MEOF	5'-TACCAATATAGTACAGAAACTG-3'	Universal

La calidad de los productos de amplificación (banda única y evidente) y su tamaño fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa al 3.0%, con EZ-Vision (Amresco, OH, USA) y en tampón TAE a 100 voltios por 45 minutos; se empleó como estándar de peso molecular el Marcador SmartLadder Small Fragment (escalera de 100 pb) (Eurogentec, Angers, France).

Los triatominos infectados por *T. cruzi* fueron así identificados con claridad, visualizando los geles bajo luz UV (Figura 8), permitiendo los cálculos de prevalencia de infección.



**Figura 8. Identificación de *T. cruzi* mediante visualización de la corrida electroforética.** Los carriles 1 y 10 son el marcador molecular (escalera 100 pb); carriles 6, 7 y 8 son los controles positivos (de 150, 200 y 250 pb respectivamente) y el carril 9 es el control negativo. Cada carril de corrida representa un individuo de *T. infestans*: los carriles 3, 4, 5 y 15 son muestras positivas para *T. cruzi* (250 pb que corresponde a *TcII*). Los carriles 2, 11 al 14, son muestras que no presentaron el parásito.

### 3.4. ANÁLISIS DE LAS HETEROGENEIDADES EN EL CÁLCULO DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN

Dentro de los factores de heterogeneidad en la prevalencia de infección de los triatominos por *T. cruzi* existen dos dimensiones interrelacionadas que se logró analizar con los datos del estudio:

- Una dimensión temporal; relacionada con el período de tiempo que vive el insecto (representada por los estadios de desarrollo),

suponiendo que la probabilidad de infectarse aumenta con el tiempo de vida o estadio de desarrollo (por la frecuencia de alimentación).

- Una dimensión espacial; debida a aspectos etológicos del insecto, que se desarrolla en colonias y con poca dispersión, la probabilidad de infección dependerá del entorno de los insectos (ej. hospederos infectados).

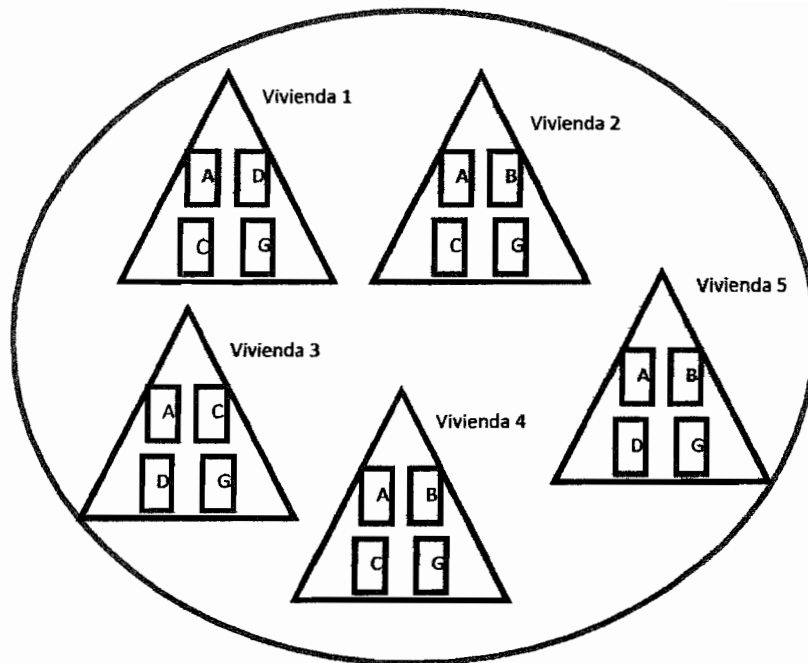
### **3.4.1. Análisis de la dimensión temporal de heterogeneidad**

Seis categorías fueron analizadas, representadas por el estadio de desarrollo de *T. infestans*: N1, N2, N3, N4, N5 y Adultos (subdivididos en hembra y macho).

### **3.4.2. Análisis de la dimensión espacial de heterogeneidad**

Tres niveles espaciales fueron analizados (Figura 9):

- La heterogeneidad en la prevalencia de infección entre comunidades
- La heterogeneidad de la prevalencia de infección entre viviendas de una misma comunidad
- La heterogeneidad de la prevalencia de infección entre ambientes de una misma vivienda, y entre usos domésticos de los ambientes de una comunidad



**Figura 9. Clasificación de las poblaciones de *T. infestans* según la espacialidad geográfica.** Para el análisis de la variación de las prevalencia de infección, las poblaciones de *T. infestans* se clasificaron a nivel macro- y micro-geográfico: a nivel macro-geográfico se comparó la prevalencia entre comunidades (la circunferencia verde indica el límite de la comunidad). A nivel micro-geográfico se comparó la prevalencia entre viviendas (triángulos azules), y entre las estructuras de una misma vivienda (rectángulos violetas), a la vez estos ambientes (A, B, C, D y G) tienen diferentes usos (como almacén de viveres, diversos, cocina, dormitorio, gallinero/corral, respectivamente).

### 3.5. COMPARACIÓN DE ESTRATEGIAS DE MUESTREO EN EL CAMPO POR SIMULACIONES

Para comparar la variación en las prevalencias de infección según diferentes esfuerzos de muestreo y estrategias de muestreo, se realizaron simulaciones a partir de las poblaciones de *T. infestans* que se obtuvieron de cada comunidad en estudio. Estas simulaciones se realizaron bajo los siguientes criterios:

- **Muestreo aleatorio** de toda la comunidad con diferente tamaño de muestra respecto al total de insectos capturados en la respectiva comunidad. Se simuló muestreos de 50%, 40%, 30% y 20%, tomando al azar la cantidad respectiva de insectos a partir del número total de individuos que sirvieron para el cálculo de la prevalencia “real” de cada comunidad. Este tipo de simulación permite conocer si existe un límite inferior de muestreo (número mínimo de insectos a capturar) para calcular una prevalencia de manera óptima.
- **Muestreo aleatorio estratificado** según vivienda. Para esto se consideró tomar diferente número de viviendas (50% y 20% según el total de viviendas en una comunidad) y en ambos casos también se trabajó con diferente tamaño de muestra de *T. infestans* (100% y 20% de los insectos capturados en cada vivienda, simulando así un muestreo minucioso de la vivienda o un muestreo sin mucho esfuerzo). En esta estrategia de muestreo, se pretende conocer un número óptimo de viviendas a muestrear en una comunidad y, dentro de las viviendas seleccionadas, el esfuerzo de muestreo (esfuerzo importante, con una búsqueda minuciosa para capturar 100% de los insectos presentes, o un esfuerzo débil con el cual se captura solamente 20% de los insectos presentes)

Las simulaciones de muestreo se realizaron con cien repeticiones y se efectuaron con la ayuda del programa *STATISTICA 8*, y se obtuvieron nuevamente las prevalencias de infección.

### 3.6. PRUEBAS ESTADÍSTICAS

El cálculo de las prevalencias de infección se hizo tomando en cuenta las diferentes fuentes de heterogeneidad estudiadas: la comunidad, las viviendas, el tipo de estructura



(dormitorio, gallinero etc.) y estadio ninfal del insecto. Las prevalencias de infección en *T. infestans* fueron calculadas con intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Las comparaciones entre varias prevalencias se hicieron con la prueba de razón de verosimilitud ( $G$ ) al 95% de significancia ( $\alpha=0.05$ ) (Steel & Torrie 1992).

La comparación de las prevalencia obtenidas después de las simulaciones (es decir con un muestreo limitado de insectos) y la prevalencia “real” obtenida con el muestreo total de los insectos en el terreno, se realizó obteniendo primero la media de las prevalencias después de las 100 simulaciones y comparándola con la prevalencia “real” de la respectiva comunidad mediante una prueba  $t$  de Student para una muestra con 95% de significancia ( $\alpha=0.05$ ) (Steel & Torrie 1992).

Los diversos cálculos fueron realizados con los programas de estadísticas STATISTICA (ver. 8.0) o SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, versión 18.0, SPSS Inc.).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES EN ESTUDIO

En las cuatro comunidades, un total de 263 viviendas fueron muestreadas, de las cuales 188 estaban infestadas por lo menos con un individuo de *T. infestans*. El índice de infestación general fue de 71% variando entre comunidades de 56% (Eje Pampa) a 86% (Palmarito) (Tabla 6). Las comunidades de Palmarito y La Brecha presentan los índices de infestación general más elevados (86% y 74% respectivamente), y en las mismas se ha encontrado la mayor proporción de viviendas con *T. infestans* infectados con *T. cruzi* (64% y 57% respectivamente).

Tabla 6: Viviendas estudiadas por comunidad.

Comunidad de captura	Viviendas existentes y analizadas	Viviendas con <i>T. infestans</i>	Promedio insectos encontrados /vivienda (min-max)	Índice de infestación	Viviendas con <i>T. cruzi</i> (% viviendas con <i>T. infestans</i> infectados)
La Brecha	88	65	15 (1-170)	74 %	37 (57%)
Palmarito	80	69	16 (1-160)	86 %	44 (64%)
Lagar Pampa	43	25	13 (1-88)	58 %	6 (24%)
Eje Pampa	52	29	33 (1-154)	56 %	11 (38%)
Total	263	188		71 %	92 (52%)

Un total de 3410 insectos se identificaron como *T. infestans*, el 30% fueron capturados en La Brecha, 33% en Palmarito, 28% en Eje Pampa y 9% en Lagar Pampa. La estructura

poblacional por estadio de desarrollo se muestra en la Tabla 7. El 9% de los insectos eran N1; 9% N2; 14% N3; 17% N4; 24% N5 y el 26% eran adultos (43% hebras y 57% machos).

**Tabla 7: Macro poblaciones de *T. infestans* bajo estudio**

Comunidad de captura	Número de individuos por estadio							Total
	N1	N2	N3	N4	N5	♀	♂	
La Brecha	135	158	149	111	208	100	135	996
Palmarito	30	39	132	238	345	173	169	1126
Lagar Pampa	20	42	65	49	65	23	55	319
Eje Pampa	107	78	144	189	208	90	153	969
Total	292	317	490	587	826	386	512	3410

## 4.2. HETEROGENEIDAD DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN ENTRE COMUNIDADES

La prevalencia de infección general en cada comunidad se muestra en la Tabla 8, donde La Brecha presenta el valor más alto (33%) en comparación con las demás comunidades (18% en Palmarito, 11% en Eje Pampa y 5% en Lagar Pampa).

**Tabla 8: Prevalencias de infección de *T. infestans* en las cuatro comunidades en estudio.**

Comunidad analizada	Número de insectos capturados	Insectos positivos	Prevalencia (IC 95%)
La Brecha	996	333	0.33 (0.31-0.36)
Palmarito	1126	208	0.18 (0.16-0.21)
Eje Pampa	969	105	0.11 (0.9-0.13)
Lagar Pampa	319	15	0.05 (0.02-0.07)

Las prevalencias globales son significativamente diferentes entre las cuatro comunidades ( $G= 220.98$ ,  $g.l.=3$   $P<0.001$ ). Esta diferencia en las prevalencias de infección también se observa entre comunidades de la misma eco-región. En el Chaco, la diferencia entre Palmarito y La Brecha es significativa ( $G=62.48$ ,  $g.l.=1$ ,  $P<0.001$ ), al igual que entre Lagar Pampa y Eje Pampa en los Valles ( $G=12.19$ ,  $g.l.=1$ ,  $P<0.001$ ).

#### **4.3. HETEROGENEIDAD ENTRE VIVIENDAS DE UNA MISMA COMUNIDAD**

La prevalencia varía significativamente entre viviendas de una misma comunidad (Tabla 9).

**Tabla 9: Prevalencias de infección en viviendas de cada comunidad. \* Tomando en cuenta las viviendas que tenían mayor número de insectos capturados ( $n > 39$ ).**

Comunidad	Código de la vivienda*	Insectos capturados	Insectos positivos	Prevalencia (IC 95%)	Razón de verosimilitud (gl.) Probabilidad P
Eje Pampa	102	70	0	0%	G (6)= 76.7 P < 0.001
	107	154	9	6% (2-10%)	
	207	93	3	3% (0-7%)	
	301	65	0	0%	
	308	80	26	33% (22-43%)	
	401	79	8	10% (3-17%)	
	406	137	25	18% (12-25%)	
La Brecha	405	145	85	59% (51-67%)	G (2)= 27.8 P < 0.001
	411	170	99	58% (51-66%)	
	422	136	43	32% (24-39%)	
Lagar Pampa	420	88	8	9 (3-15%)	G (2)= 1.29 P = 0.525
	CV62A	45	2	4% (0-12%)	
	CV71	39	2	5% (0-12%)	
Palmarito	112	160	18	11% (6-16%)	G (3)= 5.32 P = 0.150
	408	42	7	17% (5-28%)	
	416	53	11	21% (10-32%)	
	504	69	15	22% (12-31%)	

En Eje Pampa, de siete viviendas altamente infestadas (número de triatomíneos  $> 39$  en cada una de las viviendas), la prevalencia de infección en los triatomíneos varía de 0 a 33% ( $P < 0.001$ ). En La Brecha, tres casas altamente infestadas mostraron prevalencias estadísticamente diferentes entre 32% y 59% ( $P < 0.001$ ). Por otro lado, en Lagar Pampa y Palmarito, no se observó diferencias significativas entre viviendas ( $P > 0.05$ ). La prevalencia de infección varió entre 5 y 9% en Lagar Pampa y entre 11 y 21% en Palmarito (Tabla 9).

## **4.4. HETEROGENEIDAD ENTRE ESTRUCTURAS DE UNA MISMA VIVIENDA Y SEGÚN USO DOMÉSTICO**

### **4.4.1. Heterogeneidad entre estructuras de una vivienda**

Analizando en detalle las viviendas de la tabla anterior (Tabla 9), se observó diferencias en la prevalencia de infección entre estructuras de las viviendas (Tabla 10). Por ejemplo, la vivienda N°308 en Eje Pampa estaba constituida de un almacén y de un dormitorio. La prevalencia en el almacén fue de 0% mientras en el dormitorio fue de 44.8%. Sin embargo, en las otras viviendas, no se observó tal diferencia.

Tabla 10: Comparación de las prevalencia de infección entre ambientes domiciliarios. \*Las estructuras designadas como usos "diversos" en Lagar Pampa y Eje Pampa, son ambientes que no tiene una funcionalidad definida, pueden ser depósitos con la presencia de otros animales.

Vivienda	Ambiente (uso)	Insectos capturados	Insectos positivos	Prevalencia	Razón de verosimilitud (g/l) Probabilidad P
308-Eje Pampa	A (almacén)	22	0	0%	21.1 (1) P<0.001
	B (dormitorio)	58	26	44.8%	
422-La Brecha	A (almacén)	6	4	67%	3.25 (1) P=0.07
	B (dormitorio)	130	39	30%	
504-Palmarito	B (dormitorio)	45	10	22%	0.018(1) P=0.894
	C (gallinero)	24	5	21%	
420-Lagar Pampa	G (baño)	33	5	15%	3.24 (1) P=0.07
	BC (diversos)*	51	2	4%	

#### 4.4.2. Heterogeneidad según uso de los ambientes domiciliarios

Al comparar entre ambientes con un determinado uso doméstico, en cada comunidad existen diferencias significativas ( $P<0.05$ ). Los dormitorios aparecen como los lugares donde la prevalencia de infección de los triatomíneos es la más elevada, por lo menos en La Brecha, Palmarito y Eje Pampa, con valores de 19% a 36%. Los almacenes también parecen ser lugares donde la prevalencia de infección en *T. infestans* es relevante (alrededor del 20%). Los lugares donde la prevalencia de infección es la más baja son en general los gallineros y corrales donde la prevalencia varía de 0% al 10% (Tabla 11).

Tabla 11: Comparación en las prevalencias de infección entre estructuras con diferentes usos. \*Las estructuras designadas como usos "diversos" son ambientes que no tiene una funcionalidad definida, pueden ser depósitos con la presencia de otros animales.

Uso de estructura	Prevalencia de infección por comunidad (IC 95%)			
	Eje Pampa	Lagar Pampa	La Brecha	Palmarito
Dormitorio	23% (16-31%)	6% (2-10%)	36% (33-39%)	19% (17-22%)
Cocina	6% (0-12%)	-	17% (0-34%)	12% (0-27%)
Almacenamiento	19% (12-27%)	0%	13% (5-21%)	23% (15-32%)
Baño	4% (0-10%)	15% (3-27%)	-	-
Diversos*	5% (2-9%)	3% (0-7%)	-	-
Corral	9% (6-13%)	0%	0%	0%
Gallinero	4% (1-8%)	0%	8% (0-19%)	10% (3-18%)
Troje	15% (5-24%)	-	-	0%
Razón de verosimilitud (g.l.)	41.7 (7)	12.3 (5)	34.4 (4)	11.9 (5)
Probabilidad P	$P < 0.001$	$P < 0.05$	$P < 0.001$	$P < 0.05$

#### 4.5. VARIACIÓN DE LA PREVALENCIA ENTRE ESTADIOS DE *T. INFESTANS*

La prevalencia de infección según los diferentes estadios de *T. infestans* varía de forma diferente según la comunidad en estudio (Tabla 12), este escenario se muestra claramente cuando comparamos los estadios menores (N1+N2+N3+N4) con los grandes (N5 + Adultos) (Figura 10).



Tabla 12: Prevalencias de infección por *T. cruzi* (en %) en diferentes estadios de *T. infestans*. Entre paréntesis se indica el intervalo de confianza al 95%

Comunidad	Estadio de desarrollo de <i>T. infestans</i>						
	N1	N2	N3	N4	N5	♂	♀
Eje Pampa	21 (14-29)	12 (4-19)	15 (9-21)	7 (4-11)	5 (2-8)	12 (7-18)	9 (3-15)
Lagar Pampa	0	5 (0-11)	3 (0-7)	2 (0-6)	5 (0-10)	7 (0-14)	13 (0-27)
La Brecha	34 (26-42)	35 (27-42)	36 (29-44)	27 (19-35)	29 (23-35)	38 (30-46)	37 (28-46)
Palmarito	0	5 (0-12)	13 (7-19)	18 (13-22)	17 (13-21)	22 (16-28)	30 (23-37)

En las comunidades de Palmarito y Eje Pampa, las diferencias son significativas entre estadios ( $G_6 = 36.89$ ,  $P < 0.001$  y  $G_6 = 25.77$ ,  $P < 0.001$  respectivamente). En Palmarito, la prevalencia de infección posee una tendencia creciente con el estadio de los insectos, pasando de 0% en las N1 a  $\approx 20 - 30\%$  en los adultos (Figura 10a). En Eje Pampa, la tendencia es a la inversa, con una prevalencia más elevada en los estadios menores ( $\approx 20\%$  en las N1), que en los estadios grandes ( $\approx 4-7\%$  en N4-N5) (Figura 10d).

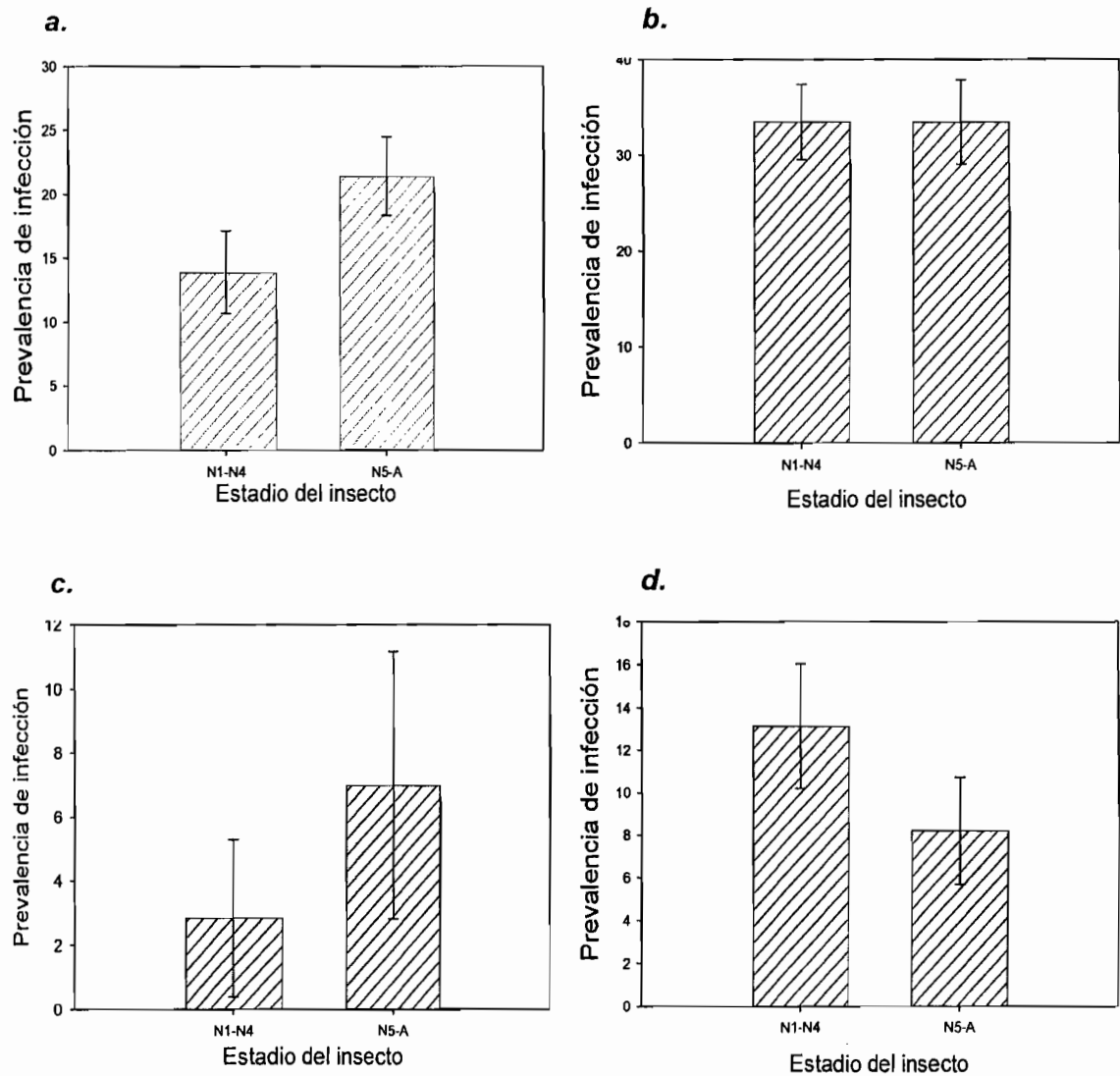


Figura 10. Comparación de prevalencias de infección entre estadios en las cuatro comunidades en estudio. *a.* Palmarito, *b.* La Brecha, *c.* Lagar Pampa y *d.* Eje Pampa

En Lagar Pampa y La Brecha, la prevalencia de infección en los triatominos no varía significativamente entre estadios de desarrollo ( $G_6 = 6.49$ ,  $P = 0.370$  y  $G_6 = 6.50$ ,  $P = 0.369$ )

respectivamente). En Lagar Pampa, la prevalencia se mantiene  $\approx 5-10\%$  (Figura 10c) y en La Brecha, el valor oscila entre 27-37% (Figura 10b).

#### 4.6. PREVALENCIA DEL PARÁSITO SEGÚN LOS DTUS

La Tabla 13 muestra la proporción de los grupos de DTU de *T. cruzi* en los triatominos de cada comunidad. El grupo TcII-V-VI es el grupo predominante en las comunidades de La Brecha (49%), Palmarito (67%) y Lagar Pampa (40%), indicando una circulación predominantemente doméstica del parásito. Sin embargo, en Palmarito y Lagar Pampa, se observó también una alta proporción del grupo TcI ( $\approx 25-30\%$ ), indicando la circulación de *T. cruzi* proveniente del ciclo silvestre. En La Brecha, también se observaron importantes proporciones del grupo TcIII-IV. Este grupo es el más abundante en Eje Pampa, y el grupo TcII-V-VI es el de menor proporción. En Eje Pampa, es también sobresaliente la presencia del grupo TcI, indicando un ciclo silvestre.

En todas las comunidades (menos Eje pampa) se observó infecciones mixtas en baja proporción (< 7% como máximo).

Tabla 13: Proporción de los DTUs de *T. cruzi* (% de triatominos infectados por comunidad)

Grupo de DTU	La Brecha	Palmarito	Lagar Pampa	Eje Pampa
TcI	5	24	33	38
TcIII-IV	43	8	20	54
TcII-V-VI	49	67	40	8
Infecciones mixtas	4	1	7	0

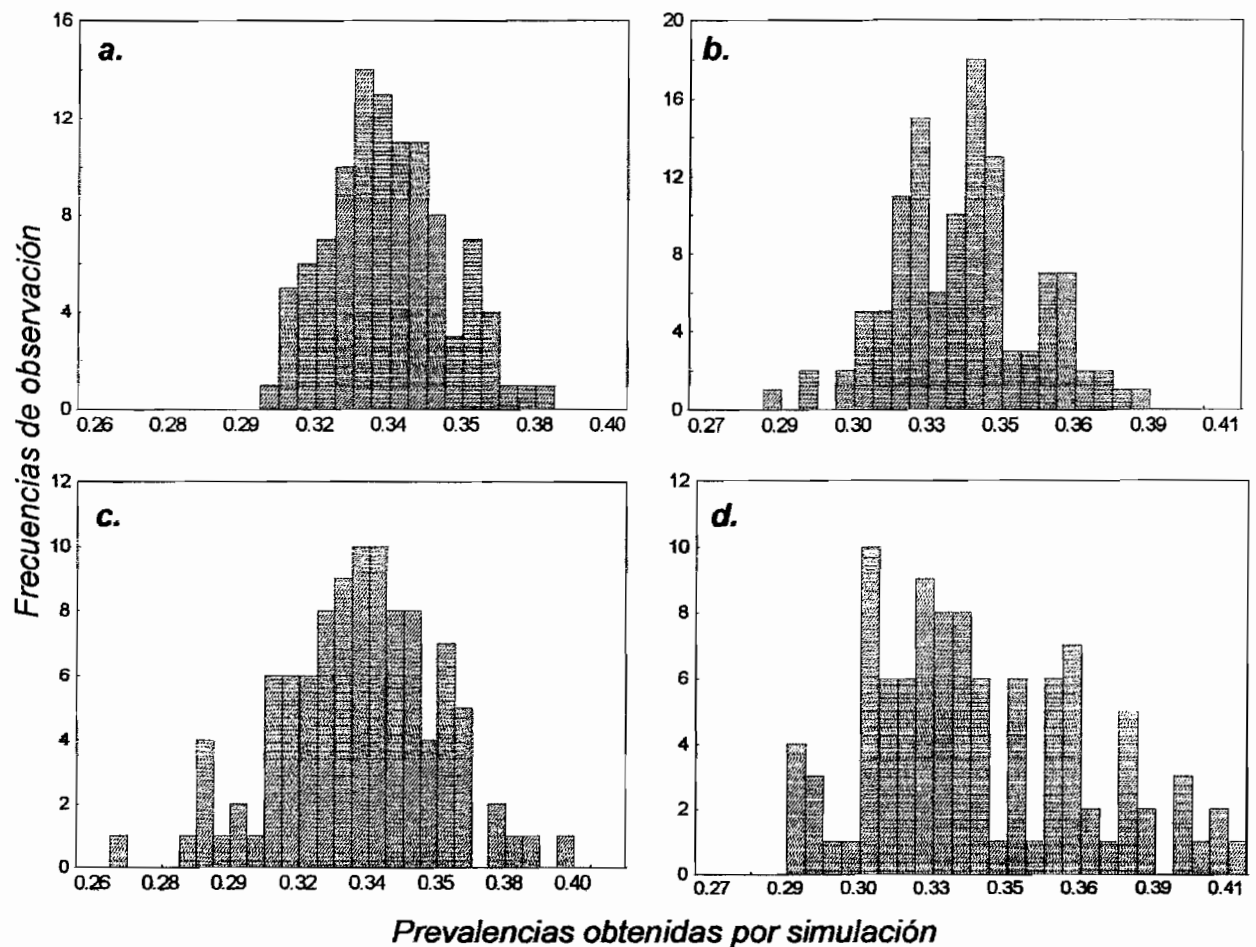
## **4.7. SIMULACIONES DE ESTRATEGIAS DE MUESTREO DE TRIATOMINOS EN EL CAMPO**

### **4.7.1. Muestreo aleatorio de los insectos**

En esta estrategia de muestreo, se simuló un muestreo al azar 100 veces, con muestras del 50%, 40%, 30% o 20% de los insectos capturados en cada comunidad, y se estimó la prevalencia de infección. El promedio obtenido fue comparado a la prevalencia global, pero también los valores extremos (mínimo y máximo) obtenidos en las simulaciones, para examinar la probabilidad de encontrar un valor demasiado alejado al valor real.

#### **4.7.1.1. Muestreos aleatorios en la comunidad La Brecha**

En la Brecha se capturaron 996 insectos, por lo que con las simulaciones del 50% de los insectos se obtuvo un promedio de 500 insectos por aleatorización (min=452; max=545). Igualmente, con 40%, 30% y 20% de los insectos potenciales, se sortearon un promedio de 400 (min=445; max=364), 300 (min=326; max=265) y 200 (min=228; max=168) insectos respectivamente. La distribución de los valores de prevalencia obtenidas con 100 simulaciones en cada tipo de sorteo se muestran en la Figura 11.



**Figura 11.** Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para La Brecha: *a.* con el 50% del total de insectos, *b.* con el 40% de los insectos, *c.* con el 30% de los insectos y *d.* con el 20% de los insectos.

Mediante el test de *t* de Student no se identificó ninguna diferencia significativa entre las prevalencias medias de cada tipo de aleatorización y la prevalencia “real” calculada con el total de insectos de La Brecha y estimada a 33% (Tabla 14).

**Tabla 14: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en La Brecha. Valores de las medias obtenidas para los cuatro tipos de muestreo y su comparación con la prevalencia obtenida en La Brecha (0.3343) mediante la prueba t de Student.**

Muestreo respecto al total de insectos "potenciales" (n=996)	Resultado de la simulación			t (gl.) P
	Media (±terr. est.)	Max	Min	
50%	0.334 (±0.0015)	0.37	0.30	0.13 (102) P= 0.89
40%	0.334 (±0.0018)	0.38	0.29	-0.08 (113) P=0.93
30%	0.332 (±0.0023)	0.39	0.26	-0.97 (101) P=0.33
20%	0.337 (±0.0029)	0.41	0.29	0.97 (99) P=0.33

Sin embargo, se observó variaciones entre los valores máximos y mínimos de la prevalencia en las simulaciones (Tabla 14). Los valores máximos de prevalencia calculada varían de 0.37 (con 50% de los insectos) a 0.41 (con 20% de los insectos). Los valores mínimos varían de 0.26 a 0.30. Estos valores fueron comparados con el valor "real" y no se detectó ninguna diferencia cuando 50% (max:  $\chi^2=1.78$ ; y min:  $\chi^2=1.36$ ;  $P>0.05$  en ambos casos) o 40% (max:  $\chi^2=2.74$ ; y min:  $\chi^2=2.22$ ;  $P>0.05$  en ambos casos) de los insectos fueron muestreados. Sin embargo, la diferencia entre en la prevalencia de infección "real" y el mínimo valor obtenido con 30% de los insectos (0.26) fue del 7% siendo estadísticamente diferente ( $\chi^2=4.84$ ;  $P=0.03$ ). Del mismo modo, la diferencia entre el valor "real" y el valor máximo, obtenido con 20% de los insectos (0.41) fue del 8% siendo significativo ( $\chi^2=3.98$ ;  $P=0.045$ ).

Las distribuciones de las prevalencias simuladas por tipo de sorteo indican que con un esfuerzo menor (20% de los insectos potenciales), hay más probabilidades de encontrar valores extremos (mínimas o máximas) alejados del valor "real" (Figura 11). Eso también se detecta con el aumento en el intervalo de confianza a medida que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 14;Figura 12).

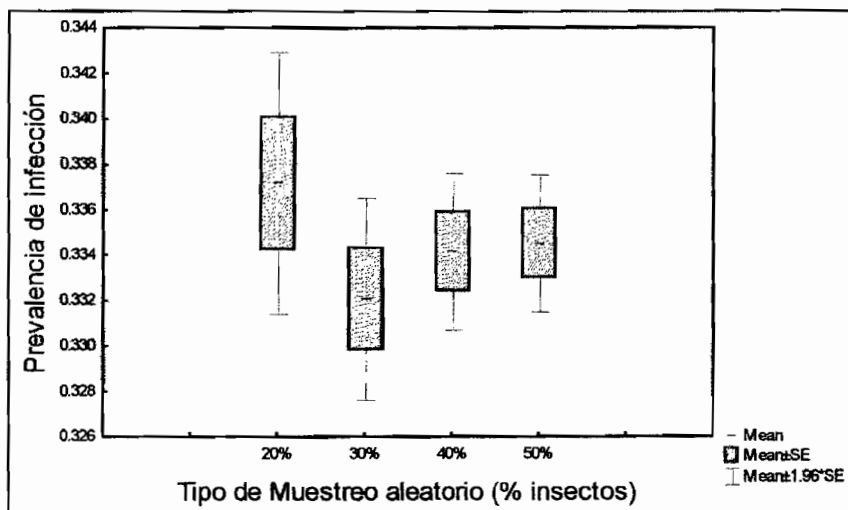


Figura 12. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en La Brecha. (IC del 95%).

Los resultados indican que con un esfuerzo de muestreo menor, es decir con pocos insectos capturados, la prevalencia de infección en triatomíneos tiende ser erróneamente estimada.

#### 4.7.1.2. Muestras aleatorias en la comunidad Palmarito

En Palmarito se capturaron 1126 insectos, por lo que con las simulaciones del 50% de los insectos se obtuvo un promedio de 561 insectos por aleatorización (min=521; max=602). Igualmente, con 40%, 30% y 20% de los insectos potenciales, se sortearon un promedio de 449 (min=406; max=486), 338 (min=289; max=381) y 225 (min=192; max=249) insectos respectivamente para cada sorteo. La distribución de los valores de prevalencia obtenidas con 100 simulaciones en cada tipo de sorteo se muestran en la Figura 15 (Anexo 2).

Mediante el test de *t* de Student no se identificó diferencias significativas entre las prevalencias medias de cada tipo de aleatorización y la prevalencia “real” calculada con el total de insectos de Palmarito y estimada a 18% (Tabla 15)

**Tabla 15: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en Palmarito. Valores de las medias obtenidas para los cuatro tipos de muestreo y su comparación con la prevalencia obtenida en Palmarito (0.1847) mediante la prueba t de Student.**

Muestreo respecto al total de insectos "potenciales" (n=1126)	Resultado de la simulación			t (gl.) P
	Media (±err. est.)	Max	Min	
50%	0.185 (±0.0011)	0.21	0.16	0.40 (99) P=0.68
40%	0.183 (±0.0013)	0.21	0.15	-1.03 (99) P=0.30
30%	0.186 (±0.0014)	0.23	0.16	1.31 (99) P=0.19
20%	0.184 (±0.0024)	0.24	0.10	-0.22 (99) P=0.82

En las simulaciones, los valores máximos variaron de 0.21 (con 50% de los insectos) a 0.24 (con 20% de los insectos). Los valores mínimos estuvieron entre 0.10 y 0.16 (Tabla 15). Estos valores fueron comparados con el valor "real" de prevalencia de infección donde el máximo valor difiere en un 6% al "real", no se detectó ninguna diferencia significativa ( $\chi^2=0.004$ ,  $P>0.05$ ) en ninguno de los casos, exceptuando el valor mínimo de la simulación del 20% de insectos en la que se observó que difería de la "real" en un 8% con diferencias significativas ( $\chi^2=8.54$ ,  $P=0.003$ ). Las distribuciones de las prevalencias por tipo de sorteo indican que con un esfuerzo menor (20% de los insectos potenciales), hay más probabilidades de encontrar valores extremos (mínimos o máximos) alejándose del valor "real" (Figura 15 en Anexo 2). Eso también se detecta con el aumento en el intervalo de confianza a medida que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 15) y (Figura 16 en Anexo 2).

Al igual que para La Brecha, los resultados indican que con un esfuerzo de muestreo débil, la prevalencia de infección en triatomíinos puede ser erróneamente estimada.



#### 4.7.1.3. Muestréos aleatorios en la comunidad Lagar Pampa

En Lagar Pampa se tuvo un total de 319 insectos por lo que en las simulaciones con el 50% se obtuvo un promedio de 159 insectos (max=182, min=129), con 40% 129 (max=147, min=106), con 30% 96 (max=113, min=81) y con 20% 65 insectos (max=90, min=45). La distribución de los valores de prevalencia obtenidas con 100 simulaciones en cada tipo de sorteo se muestran en la Figura 17 (Anexo 2).

Mediante la prueba *t* de Student no se observaron diferencias significativas al comparar las prevalencias medias obtenidas por simulación con la prevalencia “real” en Lagar Pampa estimada a 5% (Tabla 16).

**Tabla 16: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en Lagar Pampa. Valores de las medias obtenidas para los cuatro tipos de muestreo y su comparación con la prevalencia obtenida en Lagar Pampa (0.0470) mediante la prueba *t* de Student.**

Muestreo respecto al total de insectos “potenciales” (n=319)	Resultado de la simulación			<i>t</i> (gl.) <i>P</i>
	Media (±err. est.)	Max	Min	
50%	0.047 (±0.0013)	0.08	0.02	0.15 (99) 0.87
40%	0.047 (±0.0016)	0.10	0.02	-0.006 (99) 0.99
30%	0.047 (±0.0017)	0.09	0	0.27 (99) 0.78
20%	0.048 (±0.0025)	0.13	0	0.60 (99) 0.54

En las simulaciones, los valores de prevalencia máximos hallados fueron de 8% a 13% y los mínimos de 0% a 2%. Al comparar cada uno de estos valores con el de la prevalencia “real” se obtuvo que para las simulaciones del 50% y 40% no hay diferencias significativas ( $\chi^2=0.004$ ,  $P>0.05$  para todos los valores), pero al comparar el valor máximo obtenido en la aleatorización del 20% de insectos, se observó una variación con la “real” de 8% la cual es

significativa ( $\chi^2=4.98, P=0.02$ ). Al comparar el valor mínimo obtenido en la aleatorización de 30%, se observó una variación del 5% siendo esta significativamente diferente a la “real” ( $\chi^2=3.39, P=0.02$ ).

Al igual que para las anteriores comunidades, las distribuciones de las prevalencias por tipo de sorteo indican que con un menor esfuerzo de muestreo (20% de insectos potenciales), la probabilidad de encontrar valores extremos (mínimos o máximos) es mayor, y se aleja al valor “real” (Figura 17 en Anexo 2). Eso también se detecta con el aumento en el intervalo de confianza a medida que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 16) y (Figura 18 en Anexo 2).

A igual que para las comunidades anteriores, los resultados indican que con un esfuerzo de muestreo débil, la prevalencia de infección en triatominos tiende a ser erróneamente estimada. En Palmarito y La Brecha, la prevalencia real era elevada (18% y 33% respectivamente), y con las simulaciones, no se obtuvo ninguna estimación con valor cero. Sin embargo, en Lagar Pampa donde la prevalencia real era solamente de 5%, las simulaciones indicaron que hay un 6% de probabilidad de encontrar falsos negativos (valor cero) en prevalencia. Así, con un muestreo débil, las probabilidades para señalar erróneamente, que la comunidad está libre de infección, es elevada en este caso (Tabla 17).

**Tabla 17: Probabilidades de obtener un falso negativo según simulación de muestreo.**

Tipo de simulación de muestreo	Comunidad	Probabilidad de un falso negativo
Muestreo aleatorio (50%, 40%, 30% y 20% de los insectos)	La Brecha	0%
Muestreo aleatorio (50%, 40%, 30% y 20% de los insectos)	Palmarito	0%
Muestreo aleatorio (50%, 40% y 30% de los insectos)	Lagar Pampa	0%
<b>Muestreo aleatorio (20% de los insectos)</b>	<b>Lagar Pampa</b>	<b>6%</b>
Muestreo aleatorio (todos los casos)	Eje Pampa	0%

#### **4.7.1.4. Muestreos aleatorios en la comunidad Eje Pampa**

En Eje Pampa se tuvo un total de 969 insectos por lo que en las simulaciones con el 50% se obtuvo un promedio de 482 insectos (max=515, min=443), con 40% de 388 (max=419, min=351), con 30% 291 (max=324, min=266) y con 20% 194 insectos (max=219, min=166). La distribución de los valores de prevalencia obtenidas con 100 simulaciones en cada tipo de sorteo se presentan en la Figura 19 (Anexo 2).

Mediante la prueba *t* de Student no se observaron diferencias significativas al comparar la media obtenida mediante simulación con la prevalencia “real” en Eje Pampa estimada a 11% con los valores medios de las aleatorizaciones (Tabla 18).

**Tabla 18: Simulaciones de prevalencia de infección de cuatro tipos de muestreo aleatorio respecto al total de insecto en Eje Pampa. Valores de las medias obtenidas para los cuatro tipos de muestreo y su comparación con la prevalencia obtenida en Eje Pampa (0.1083) mediante la prueba t de Student.**

Muestreo respecto al total de insectos "potenciales" (n=969)	Resultado de la simulación			t (gl.) P
	Media (±err. est.)	Max	Min	
50%	0.11 (±0.0009)	0.14	0.08	-0.046(99) 0.96
40%	0.11 (±0.0012)	0.14	0.08	0.53 (99) 0.59
30%	0.10 (±0.0015)	0.14	0.06	-0.77 (99) 0.43
20%	0.10 (±0.0021)	0.16	0.06	-1.19 (99) 0.23

En las simulaciones, los valores máximos de la prevalencia fueron de 14% a 16% y los mínimos de 6% a 8%. Al comparar cada uno de estos valores con el de la prevalencia "real" de 11% se obtuvo que para todas las simulaciones no hay diferencias significativas ( $\chi^2=0.004$ ,  $P>0.05$  para todos los valores), a excepción del valor mínimo obtenido con la aleatorización del 30% de insectos. En este caso, se observó una variación con la "real" del 5% la cual fue significativa ( $\chi^2=5.55$ ,  $P=0.02$ ).

Al igual que para las anteriores comunidades, las distribuciones de las prevalencias por tipo de sorteo indican que con un menor esfuerzo de muestreo, la probabilidad de encontrar valores extremos es mayor, alejándose del valor "real" (Figura 19 en Anexo 2). Eso también se detecta con el aumento en el intervalo de confianza a medida que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 18) y Figura 20 (en Anexo 2).

En Eje Pampa, donde la prevalencia "real" de 11%, valor intermedio entre el de 5% de Lagar Pampa y los valores elevados de 18% y 33% de Palmarito y La Brecha, las simulaciones no registraron una prevalencia de cero. Así, en este caso, con un muestreo débil no se observaron falsos negativos (Tabla 17).

#### **4.7.2. Muestreo estratificado por viviendas**

En este tipo de muestreo, se eligió diferentes números de viviendas (50% y 20% del total de viviendas disponibles en cada comunidad), y en cada vivienda seleccionada, se simuló dos tipos de muestreo: un muestreo minucioso (es decir tomando en cuenta el 100% de los insectos capturados), o un muestreo parcial, tomando al azar solamente el 20% de los insectos capturados. Así, para cada comunidad, se trabajó con las siguientes proporciones de viviendas e insectos respectivamente: 50/100; 50/20; 20/100 y 20/20.

##### **4.7.2.1. Muestreos estratificados en la comunidad de La Brecha**

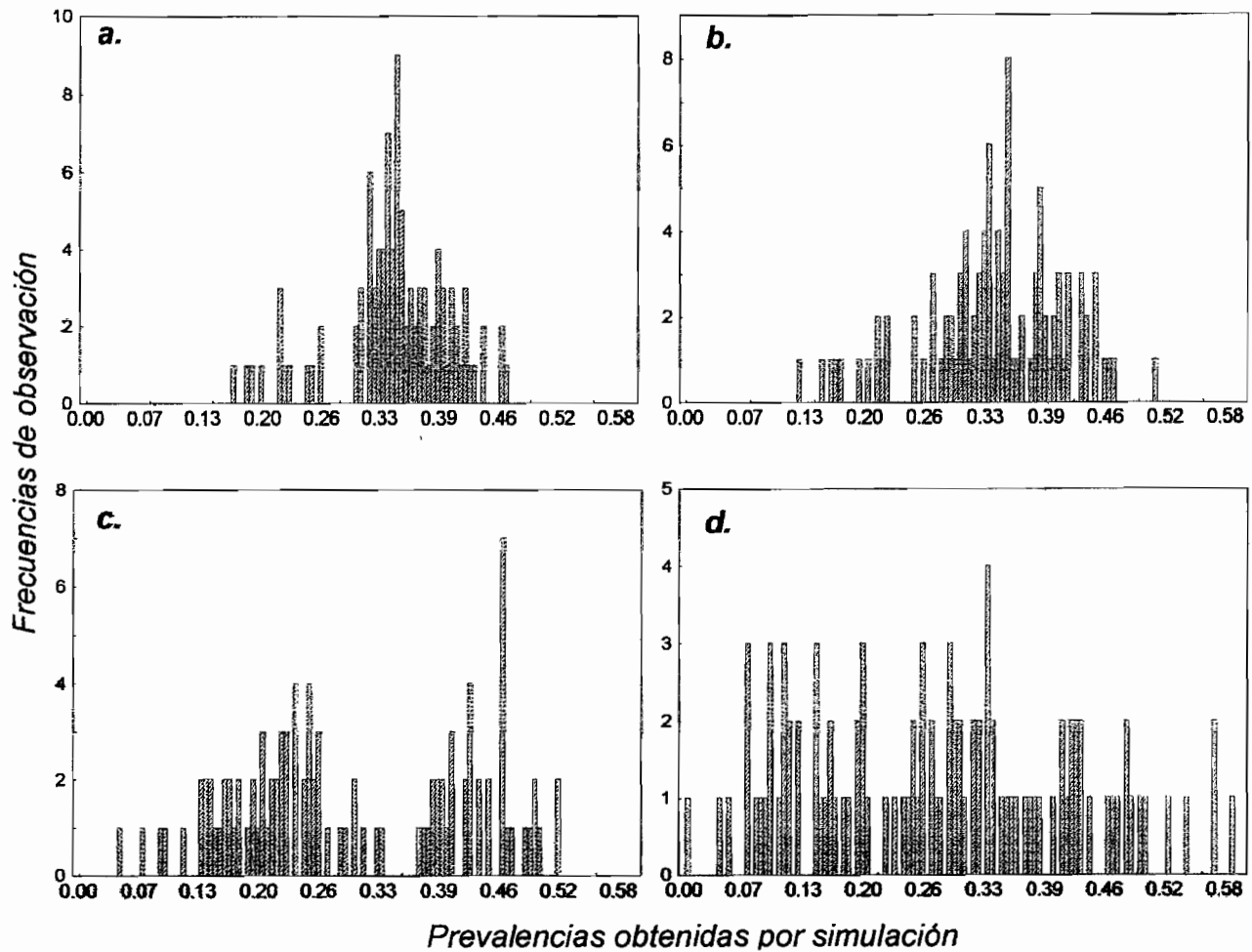
En La Brecha se muestreo un promedio de 503 insectos en la simulación de 50/100 (max=779; min=236), en la simulación 50/20 se obtuvo un promedio de 101 insectos (max=166; min=43), en la simulación de 20/100 un promedio de 196 insectos (max=604; min=54), y en la de 20/20 un promedio de 40 insectos (max=89; min=14).

La prueba de  $t$  de Student indica que hay diferencias significativas entre la prevalencia “real” de La Brecha estimada en 33% y las simulaciones de muestreo donde se toman en cuenta 20% de viviendas. No hay diferencias significativas, cuando se toman en cuenta el 50% de las viviendas (Tabla 19). Estos resultados indican que un muestreo tomando en cuenta solamente 20% (o menos) de las vivienda no proporcionará una estimación real de la prevalencia en un pueblo. También se encontró valores de prevalencia máximos que van de 46% a 59% y los mínimos de 0 a 16%, valores significativamente diferentes a la prevalencia “real” de 33% ( $\chi^2 > 0.004$ , g.l.=1,  $P < 0.05$ ). Así, en cualquier tipo de muestreo, hay riesgos en subestimar o sobrestimar la prevalencia real de manera significativa. Además, en la estrategia 20/20, se encontró una probabilidad de 1% de obtener un falso negativo (Tabla 20), aun cuando la prevalencia “real” era muy elevada (33%). Esta estrategia de muestreo, muy básica y poco fuerte, no es entonces adecuada, incluso cuando la prevalencia “real” es elevada.

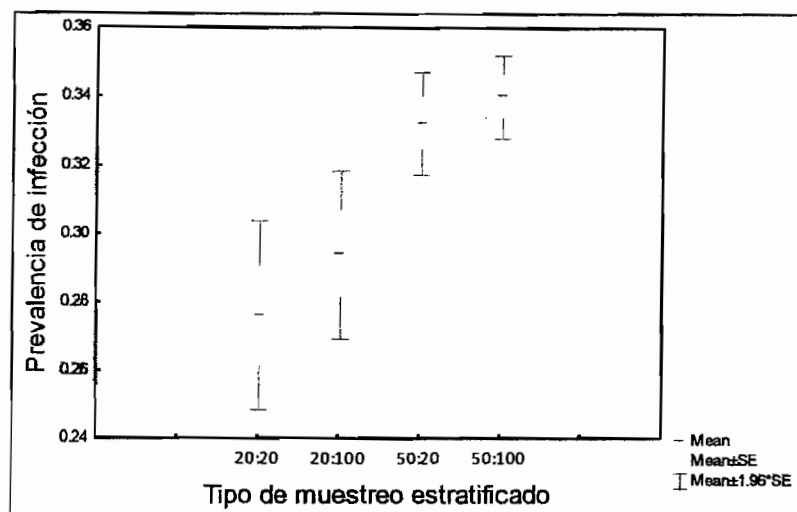
**Tabla 19: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en La Brecha. Valores para la prueba t de Student de comparación de medias (medias comparadas a: 0.33) para las prevalencias obtenidas en los cuatro tipos de muestreo aleatorio estratificado. \*\*significativamente diferente P<0.05.**

Simulación de Muestreo respecto al total de insectos "potenciales" (n=996) (%viviendas:%insectos)	Prevalencia de infección: Resultado de simulaciones			t (gl.) P
	Media (±terr. est.)	Max	Min	
50:100	0.340 (±0.0062)	0.46	0.16	0.93 (99) 0.35
50:20	0.332 (±0.0076)	0.51	0.12	-0.25 (99) 0.79
20:100	0.294 (±0.0125)	0.52	0.04	-3.21 (99) 0.001**
20:20	0.276 (±0.0142)	0.59	0.00	-4.09 (99) 0.0001**

Las distribuciones de las prevalencias por tipo de sorteo indican que con un menor esfuerzo de muestreo (20/20 de insectos potenciales), la probabilidad de encontrar valores extremos (mínimos o máximos) es mayor, alejándose del valor "real" (Figura 13). Eso también se detecta con el aumento en el intervalo de confianza a medida que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 19; Figura 14).



**Figura 13.** Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para La Brecha. *a.* simulación 50:100 (con el 100% de insectos del 50% de viviendas de la comunidad), *b.* simulación 50:20 (con el 20% de insectos del 50% de viviendas), *c.* simulación 20:100 (con el 100% de insectos del 20% de viviendas) y *d.* simulación 20:20 (con el 20% de insectos del 20% de viviendas).



**Figura 14. Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de La Brecha. a. (20:20) es un muestreo del 20% del total de viviendas y de las mismas se obtiene una muestra de 20% de insectos en cada una. b. (20:100) muestreo del 20% de las viviendas y el total de insectos de las mismas (100%). c. (50:20) muestreo del 50% de las viviendas y de cada una se obtiene el 20% de insectos. d. (50:100) muestreo del 100% de insectos en el 50% de las viviendas de la comunidad.**

El hecho de encontrar un falso negativo en la estrategia (20/20) (Tabla 20), demuestra que cuando el esfuerzo de muestreo es bajo (20% de las viviendas y un esfuerzo bajo de búsqueda de triatominos en cada vivienda), existe una probabilidad de decir que la prevalencia de infección es cero cuando en realidad es elevada. Por eso, la estrategia de muestreo estratificado no es recomendable, sobre todo si el esfuerzo de muestreo es bajo.



**Tabla 20. Probabilidades de obtener un falso negativo según simulación de muestreo estratificado. Entre paréntesis están las proporciones de las viviendas seleccionadas y la proporción de insectos muestreados en cada una**

Tipo de simulación de muestreo	Comunidad	Probabilidad de un falso negativo
Muestreo aleatorio estratificado (20% / 20%)	La Brecha	1%
Muestreo aleatorio estratificado (todos los tipos)	Palmarito	0%
Muestreo aleatorio estratificado (50% / 20%)	Lagar Pampa	32%
Muestreo aleatorio estratificado (20% / 100%)	Lagar Pampa	21%
Muestreo aleatorio estratificado (20% / 20%)	Lagar Pampa	57%
Muestreo aleatorio estratificado (20% / 100%)	Eje Pampa	3%
Muestreo aleatorio estratificado (20% / 20%)	Eje Pampa	5%

#### **4.7.2.2. Muestreos estratificados en la comunidad de Palmarito**

En Palmarito, para el sorteo 50/100 se obtuvo un promedio de 548 insectos (max=752; min=324), en el sorteo de 50/20 se obtuvo un promedio de 108 insectos (max=153; min=66), en la simulación de 20/100 un promedio de 229 insectos (max=446; min=108), y en la de 20/20 un promedio de 45 (max=96; min=21).

Las pruebas de *t* de Student indican que hay diferencias significativas entre la prevalencia “real” de Palmarito estimada a 18% y la simulaciones 50/20. En las demás simulaciones no se encontró diferencias significativas (Tabla 21). También se encontró valores de prevalencia máximos que van de 27% a 41% y los mínimos de 4% a 13% y al comparar estos valores extremos con la prevalencia “real”, se halló que en todos los casos hay diferencias significativas ( $\chi^2 > 0.004$ , g.l.=1,  $P < 0.05$ ).

Las distribuciones de las prevalencias por tipo de sorteo indican que con un menor esfuerzo de muestreo 20/20, la probabilidad de encontrar valores extremos (mínimos o máximos) es mayor (Figura 21 en Anexo 2).

Eso también se detecta con el aumento en el intervalo de confianza a medida que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 21) y (Figura 22 en Anexo 2).

**Tabla 21: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de la comunidad Palmarito.** Valores para la prueba t de Student de comparación de medias (medias comparadas a: 0.18) para las prevalencias obtenidas en los cuatro tipos de muestreo aleatorio estratificado en casas de Palmarito. \*\*significativamente diferente  $P < 0.05$ .

Muestreo respecto al total de insectos "potenciales" (n=1126) (%viviendas:%insectos)	Prevalencia de infección: Resultado de simulaciones			t (gl.) P
	Media (±terr. est.)	Max	Min	
50:100	0.18 (±0.0025)	0.27	0.13	-1.24 (99) 0.21
50:20	0.17 (±0.0039)	0.32	0.08	-2.47 (99) 0.01**
20:100	0.19 (±0.0053)	0.35	0.09	1.60 (99) 0.11
20:20	0.19 (±0.0074)	0.41	0.04	0.87 (99) 0.38

#### 4.7.2.3. Muestreos estratificados en la comunidad de Lagar Pampa

En Lagar Pampa el número promedio de triatominos sorteados por simulación fue de 150 (max=274; min=47) para la estrategia 50/100. En la simulación de 50/20, fue de 29 insectos (max=60; min=5), en la simulación de 20/100 de 58 insectos (max=170; min=7), y en la de 20/20 de 14 insectos (max=32; min=1).

La prueba de *t* de Student indica que, a excepción de la aleatorización 20/20, en todos los casos hay diferencias significativas entre la prevalencia “real” de Lagar Pampa y las simulaciones de muestreo (Tabla 22).

**Tabla 22: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de la comunidad Lagar Pampa. Valores para la prueba *t* de Student de comparación de medias (medias comparadas a: 0.047022) para las prevalencias obtenidas en los cuatro tipos de muestreo en casas de Lagar Pampa. \*\*significativamente diferente  $P < 0.05$**

Muestreo respecto al total de insectos “potenciales” (n=319) (%viviendas:%insectos)	Prevalencia de infección: Resultado de simulaciones			t (gl.) P
	Media (±err. est.)	Max	Min	
50:100	0.042 (±0.0015)	0.08	0.01	-2.88 (99) 0.005**
50:20	0.037 (±0.0034)	0.16	0.00	-2.88 (99) 0.005**
20:100	0.034 (±0.0025)	0.10	0.00	-5.09 (99) 0.00**
20:20	0.039 (±0.0067)	0.50	0.00	-1.06 (99) 0.28

También se encontró valores de prevalencia máximos que van de 8% a 50% y los mínimos de 0 a 1%, estos rangos son demasiado amplios (alto error estándar) debido a los bajos tamaños de muestra en las simulaciones, por lo que no se pudo encontrar diferencias estadísticas significativas en ninguno de los casos ( $\chi^2 > 0.004$ , g.l.=1,  $P > 0.05$ ).

Las distribuciones de las prevalencias por tipo de sorteo indican que con un menor esfuerzo de muestreo, la probabilidad de encontrar valores extremos (especialmente mínimos) es mayor. Al presentar una prevalencia “real” baja (5%) la probabilidad de encontrar valores extremos (mínimos o máximos) es mayor (Figura 23 en Anexo 2). Esto también se observa al tener intervalos de confianza amplios a medida que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 22) y (Figura 24 en Anexo 2).

Además la probabilidad de encontrar una prevalencia de cero en un muestreo de campo es también elevada con un esfuerzo de muestreo (20% de los insectos), y aun más elevada cuando se muestrean pocas viviendas (20% de las viviendas) (Tabla 20). Así, si el lugar a muestrear es sospechoso de tener una baja prevalencia de infección, la estrategia de muestreo por estratificación de vivienda no es recomendable.

#### **4.7.2.4. Muestreos estratificados en la comunidad de Eje Pampa**

En Eje Pampa, el número promedio de triatominos sorteados fue de 487 (max=767; min=249) para la estrategia de muestreo 50/100. En la simulación de 50/20, el promedio de insectos sorteados fue de 94 (max=151; min=51), en la simulación de 20/100 de 221 (max=508; min=29), y en la de 20/20 de 43 (max=106; min=6).

La prueba de  $t$  de Student indica que en las simulaciones 50/20 y 20/20 existen diferencias significativas respecto a la prevalencia total Eje Pampa (11%) y no así en las de 50/100 y 20/100 (Tabla 23). Los valores de prevalencia máximos encontrados van de 18% a 50% y los mínimos de 0 a 2%, en los cuales se encontraron diferencias estadísticas significativas respecto a la prevalencia “real” en todos los casos ( $\chi^2 > 0.004$ , g.l.=1,  $P < 0.05$ ).

Las distribuciones de las prevalencias por tipo de sorteo (Figura 25 en Anexo 2) indican que con un menor esfuerzo de muestreo, la probabilidad de encontrar valores extremos (mínimos y máximos) es mayor, alejándose aún más del valor “real”.

Esto también se observa al tener intervalos de confianza amplios a media que se reduce el tamaño de muestra (Tabla 23) y (Figura 26 en Anexo 2).

**Tabla 23: Prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Eje Pampa.**

Valores para la prueba *t* de Student de comparación de medias (medias comparadas a: 0.11) para las prevalencias obtenidas en los cuatro tipos de muestreo en casas de Eje Pampa. \*\*significativamente diferente  $P < 0.05$ .

Muestreo respecto al total de insectos "potenciales" (n=969) (%viviendas:%insectos)	Prevalencia de infección: Resultado de simulaciones			t (gl.) P
	Media (±terr. est.)	Max	Min	
50:100	0.104 (±0.0031)	0.18	0.02	-1.13 (99) 0.2605
50:20	0.093 (±0.0044)	0.20	0.01	-3.34 (99) 0.0012**
20:100	0.106 (±0.0068)	0.29	0.00	-0.22 (99) 0.8223
20:20	0.123 (±0.0093)	0.50	0.00	2.33 (99) 0.0218**

En Eje Pampa, donde la prevalencia "real" es mediana (11%), el muestreo por estratificación no es tampoco recomendable, debido a la existencia de una probabilidad de obtener una prevalencia de cero cuando en realidad no lo es (Tabla 20), sobre todo si la estrategia de muestreo es de baja calidad, es decir con pocas viviendas seleccionadas y un esfuerzo bajo de búsqueda de triatominos en las viviendas.

## 5. DISCUSIÓN

---

La enfermedad de Chagas es resultado de la interacción entre el vector triatomino, el parásito *T. cruzi* y hospederos mamíferos (WHO 1991) (Gurevitz *et al.* 2011), la problemática se debe abordar tomando en cuenta esta dinámica. Se menciona que los factores de riesgo para la infección con *T. cruzi* dependen de la coexistencia del parásito, el insecto vector, la disponibilidad del reservorio animal y las personas susceptibles dentro de ciertos rangos de factores climáticos y geográficos, en combinación con aspectos culturales, sociales y condiciones económicas. Estos factores y condiciones determinan la colonización, la alimentación y la infección de *T. infestans* (WHO 1991). Al ser la dinámica de esta enfermedad multifactorial y sus factores estar interrelacionados, se espera que el riesgo de infección en triatominos (que se refleja en la prevalencia de infección) se vea también influenciada por los factores ya mencionados (Gurevitz, *et al.* 2011).

En el presente trabajo con insectos de la especie *T. infestans* capturados en cuatro comunidades: dos del Chaco Boliviano y dos de los Valles. Estos insectos permitieron estudiar la prevalencia de infección según varios tipos de estratificación: por comunidad, por vivienda, por estructuras dentro de una vivienda, por el estadio de los insectos, y por tamaño muestral. Los resultados demostraron que la prevalencia de infección puede variar según todos estos niveles de estratificación espacial o temporal, demostrando así la dificultad de estimar una prevalencia de infección global sin tomar en cuenta una estrategia de muestreo adecuado.

A nivel espacial, los resultados mostraron que la prevalencia de infección global es variable entre comunidades. Este resultado no es sorprendente ya que cada comunidad tiene sus características propias que influyen sobre la infección de los humanos, animales y entonces de los vectores. Esto indica que la prevalencia de infección como indicador se debe realizar individualmente por comunidad y no a un nivel más grande como el Municipio o la

Provincia por ejemplo. Comparado con lo que se realiza en el Programa Departamental de Chagas (caso La Paz) (P. Vidaurre, 2013, com. pers.), este indicador entomológico es calculado por comunidad o localidad, lo cual es lo adecuado según los resultados obtenidos por Salvatella (1995). En el nivel micro-geográfico, la prevalencia de infección varía según el lugar de captura de los insectos. Por ejemplo, la prevalencia no es homogénea entre un gallinero y un dormitorio de una misma vivienda. De hecho, debido a la poca dispersión de los insectos, los que tienen acceso a gallinas (no portadores de *T. cruzi*), no serán infectados comparando a los que están en un dormitorio donde puede haber una persona o un animal portador del parásito. Los insectos pueden desplazarse, y tener acceso a diferentes fuentes de sangre, lo que influye en cuanto a su infección por *T. cruzi*. También, los animales de una comunidad pueden circular entre viviendas y así modificar las fuentes de sangre accesibles para cada colonia de insectos. Al final, estos movimientos interrelacionados pueden esconder el patrón teórico de la prevalencia (es decir su incremento con el estadio de los insectos). Aún cuando los insectos tengan la capacidad de dispersarse, esta dispersión no es suficiente para permitir una homogeneización de la prevalencia de los insectos. Así, la disponibilidad y proporción de hospederos infectados (personas, perros, gatos etc.) que es variable entre viviendas y entre estructuras de una misma vivienda influyen sobre la prevalencia de infección (Gurevitz, *et al.* 2011; Vázquez, *et al.* 1999). En consecuencia, una estimación puntual en un espacio reducido (vivienda, o aún peor en una estructura específica de una vivienda) nunca es representativa de la situación real a nivel de la comunidad.

Los resultados del estudio demostraron en particular, que el uso doméstico del ambiente llegaría a ser un factor de heterogeneidad importante. Dependiendo del lugar de captura de los triatomíneos, la prevalencia de infección puede ser sobreestimada (en caso de insectos provenientes principalmente de dormitorios por ejemplo) o subestimada (con insectos provenientes de gallineros por ejemplo). Respecto a lo que se realiza en el Programa Nacional de Chagas, no se especifica el lugar donde se capturan los triatomíneos, solo se indica si se capturaron en peri o intradomicilio, pero al ver que los triatomíneos provenientes de ambientes

con diferentes usos influye en la sub o sobre estimación de la prevalencia de infección, es recomendable que se especifique las características de uso doméstico de donde se obtienen los triatomíneos.

La estrategia de muestreo para el cálculo de la prevalencia de infección a nivel de la comunidad debe entonces, tomar en cuenta esta variabilidad micro-espacial. Otra manera tal vez de definir una prevalencia de infección en los triatomíneos, es centrar los esfuerzos de muestreo en los dormitorios donde ocurre principalmente la transmisión de Chagas a los seres humanos y proponer así una prevalencia “de dormitorio”.

Los resultados del estudio demostraron también que la prevalencia de infección varía con el estadio de los insectos. Sin embargo, el estudio no pudo demostrar una relación siempre creciente en la prevalencia de infección en los estadios de desarrollo como se esperaba o como se observó en otros estudios (Gürtler, *et al.* 1996; Gürtler, *et al.* 1998a; Gürtler, *et al.* 1998b). Esta relación es tal vez cierta dentro de una población de insectos casi aislada, con acceso a una fuente de sangre cuya tasa de infección es casi constante en el tiempo (es decir, la proporción de animales infectados sigue siendo la misma a lo largo del tiempo). La relación creciente fue observada solamente en la comunidad de Palmarito, y aparentemente en Lagar Pampa, pero debido al muestreo poco numeroso en esta comunidad (solo 15 insectos fueron encontrados positivos por *T. cruzi*), los resultados no son muy precisos. En la comunidad de La Brecha la situación es muy distinta, pues existe una alta prevalencia de infección desde los estadios menores. Esto indicaría en primer lugar, que el riesgo de infección es más alto en La Brecha que en Palmarito. En segundo lugar, que las fuentes de alimento disponibles están altamente infectadas (incluido el humano), por lo que la probabilidad de que las colonias de *T. infestans* se infecten rápidamente desde los primeros estadios ninfales es también alta (Vázquez, *et al.* 1999). En la comunidad de Eje Pampa los resultados son muy diferentes a lo que se esperaba, los estadios ninfales menores (N1 a N4) presentan prevalencias significativamente mayores que los grande (N5 y adultos) indicando en este caso una dinámica



más compleja de la circulación del parásito. Una hipótesis que podría explicar este patrón de prevalencia decreciente con la edad del vector podría ser una mortalidad diferencial debido al parásito: los estadios más avanzados tendrían una mortalidad más elevada por una determinada cepa (o DTU) de parásitos más agresiva. En este caso, factores inmunológicos podrían también interferir con el cálculo de la prevalencia de infección (García E. & Azambuja 1991; García E. S. *et al.* 1999; Garcia *et al.* 2007).

En las cuatro comunidades se hallaron los tres grupos de DTU de *T. cruzi* que puede identificar la PCR-multiplex e incluso infecciones mixtas en porcentaje menor. Estos resultados no se profundizarán aquí, pues es un nivel de complejidad más detallado sobre la dinámica del parásito, lo cual no es un objetivo del presente trabajo, y no es aspecto central en el control de la enfermedad de Chagas para el Programa Nacional, pues todos los linajes clonales de *T. cruzi* resultan ser agentes causales de la enfermedad. Es así que este nivel de complejidad, resulta interesante para futuros trabajos sobre la dinámica de las poblaciones de *T. cruzi* y sus interacciones entre parásito-parásito, parásito-vector(s) y parásito-ambiente. Estos datos, como las muestras, pueden ser usados para futuras investigaciones sobre los DTU existentes en el área de estudio, ya que no se han reportado aún trabajos sobre el tema

Es importante recalcar que el estado epidemiológico de una comunidad debe ser complementado con otros indicadores serológicos y clínicos, como la incidencia y la prevalencia de la enfermedad en la población humana (WHO 1991), pues la prevalencia de infección en *T. infestans* sólo refleja el estado de riesgo en las viviendas infestadas. Los factores ya mencionados aumentan la complejidad de la prevalencia a través de los estadios de desarrollo. Otros trabajos realizados (Giojalas, *et al.* 1990; Gürtler, *et al.* 2009; Gürtler, *et al.* 1996; Gürtler, *et al.* 1998a; Gürtler, *et al.* 1998b; Vázquez, *et al.* 1999) indican también la influencia de la época del año, proporción de reservorios infectados y otras fuentes de alimento presentes. Referente a la prevalencia según el sexo de *T. infestans* no se han reportado diferencias significativas, lo que difiere del trabajo realizado por (López, *et al.*

1999), que indica que las hembras presentan mayores tasas de infección que los machos, esto por la fase de reproducción en la que deben alimentarse con mayor frecuencia para el desarrollo de los huevos, lo cual tampoco se refleja en este trabajo.

También, el número de insectos necesarios para tener una estimación correcta de la prevalencia es de importancia. Si pocos insectos son capturados, la prevalencia tiene de hecho un intervalo de confianza grande y no puede ser usada como índice epidemiológico en el monitoreo de la transmisión.

Los resultados obtenidos con la simulación de **muestreo aleatorio** demostraron que aún cuando el cálculo promedio de la prevalencia de infección luego de 100 simulaciones es casi idéntico al valor “real”, los valores extremos pueden ser muy distintos. Así, si por “mala suerte” se realiza un muestreo con esfuerzo débil de captura de triatominos en una comunidad, el resultado podría ser muy diferente al valor “real”, y entonces no representativo de la situación en la comunidad. Por ejemplo, en La Brecha donde la prevalencia real fue de 33%, se obtuvo valores por muestreo de 26 a 41%, en Palmarito de 10 a 24% cuando la prevalencia real fue de 18%. Este fenómeno es más agudo cuando la prevalencia de infección “real” es baja, como fue el caso en la comunidad de Lagar Pampa donde la prevalencia fue de 5%. En este caso, existe una probabilidad significativa de encontrar una prevalencia de cero cuando no lo es, si el esfuerzo de muestreo es demasiado débil. En Lagar Pampa, esta probabilidad fue de 6%, es decir que de 100 “visitas” al pueblo que podría efectuar un equipo de técnicos para muestrear los triatominos, seis saldrían “negativas”, y el pueblo podría ser declarado libre de *T. cruzi*, cuando no es verdad. En caso de baja prevalencia, se debe aumentar el esfuerzo de muestreo para no cometer este error (WHO 1991). Como es de esperar, en todos los casos, un menor esfuerzo de muestreo incrementa la probabilidad de encontrar valores extremos (mínimos o máximos), alejándose del valor “real”. Y como en la práctica nunca se sabe cuál es la proporción de insectos existentes, el número de insectos óptimo a capturar, varía en cada lugar. Sin embargo, los resultados del estudio en base a las cuatro comunidades permiten decir

que una muestra al azar mayor a 200 triatomíneos es lo mínimamente óptima para tener una prevalencia que se asemeje a la real.

Si se elige hacer un **muestreo estratificado**, es decir elegir unas cuantas viviendas y dentro de cada vivienda muestrear (con un esfuerzo fuerte o débil), los resultados pueden ser muy diferentes de un sorteo al otro. También la probabilidad de tener resultados nulos de prevalencia de infección aumenta. La situación empeora aún más si el esfuerzo de muestreo dentro de cada vivienda es débil en lugar de muestrear la casi totalidad de los insectos presentes. Los resultados del estudio mostraron que es recomendable muestrear igual o mayor al 50% del total de las viviendas infestadas. Incluso cuando se muestrean la totalidad de los insectos de cada vivienda, no es recomendable muestrear pocas viviendas, pues el riesgo de falsos negativos es alto y más cuando la prevalencia tiene valores bajos.

## 6. CONCLUSIONES

---

En el presente trabajo se analizó la prevalencia de infección de *T. infestans* por *T. cruzi* o índice T/T, en relación con factores a nivel de las estrategias de muestreo que hacen que este índice entomológico refleje diferentes valores, afectando la confiabilidad de este índice en su uso como indicador de las estrategias contra esta enfermedad y/o para la estratificación de zonas de riesgo de infección vectorial para la población humana.

Se observó que el cálculo de la prevalencia de infección de *T. infestans* por *T. cruzi*, es afectado por una serie de factores a nivel espacial y temporal. A nivel temporal no se vio claramente la variación de la prevalencia, pues no se halló una relación creciente en la prevalencia de infección según los estadios de desarrollo de los insectos como se esperaba, indicando la influencia de otras particularidades del medio o incluso por la interacción vector-parásito, donde se plantea como una hipótesis el efecto mortal que pueden tener ciertos DTU sobre *T. infestans*. También se logró identificar a *T. cruzi* y sus DTU en ninfas y adultos de *T. infestans* provenientes de las comunidades del Chaco (La Brecha y Palmarito) y de los Valles (Lagar Pampa y Eje Pampa), reportando en todos los casos proporciones variables de los DTU e infecciones mixtas.

A nivel espacial, se observó que la prevalencia de infección es variable entre comunidades, por lo que este indicador se debe calcular individualmente por comunidad. A nivel micro-geográfico, la prevalencia de infección varía según el lugar de captura de los insectos (tipo de estructura y su uso doméstico), lo que tiene relación con la disponibilidad y proporción de hospederos infectados (personas, perros, gatos etc.) que varía entre viviendas y entre estructuras de una misma vivienda. Es así que la estimación de una vivienda, o aún peor, en una estructura específica de una vivienda, no puede representar la situación real de la comunidad.

El uso doméstico del ambiente es un factor de heterogeneidad importante, por el cual la prevalencia de infección puede ser sobreestimada (en caso de insectos provenientes principalmente de dormitorios) o subestimada (con insectos provenientes de gallineros).

La prevalencia de infección es un dato importante, pero para tener una idea clara de la situación epidemiológica dentro de una comunidad debe ser complementado con otros indicadores entomológicos como: el índice de infestación, el índice de densidad, el índice de hacinación y el índice de colonización; e índices de incidencia y prevalencia de la enfermedad en humanos.

La determinación más adecuada de la prevalencia de infección en *T. infestans* es un tema complejo debido a la multitud de factores que pueden influir sobre este índice que no son solamente los factores vinculados a la heterogeneidad espacial, temporal y a los sesgos de muestreo analizados en este trabajo. Es así que este nivel de complejidad, resulta interesante para futuros trabajos sobre la dinámica de las poblaciones de *T. cruzi* y sus interacciones entre parásito-parásito, parásito-vector y parásito-ambiente.

El presente trabajo es un aporte importante al PNCCH para mejorar el diseño de muestreo y la valoración del índice T/T o prevalencia de infección, con respecto a variables no estudiadas anteriormente: espacial y temporal (etárea), sobre las cuales se deben tomar en cuenta las siguientes recomendaciones para perfeccionar la estimación de la prevalencia de infección a nivel de una comunidad:

- Realizar un muestreo aleatorio por búsqueda activa de por lo menos 200 insectos, en más del 50% de viviendas en las que se encontró *T. infestans* (infestadas) pues por debajo de este porcentaje, hay mayor probabilidad de tener falsos negativos respecto a la prevalencia de

infección, y este riesgo es mayor cuando la prevalencia va disminuyendo.

- Se debe tomar en cuenta que las viviendas se componen de ambientes de diferentes usos domésticos, y se observó que el lugar de obtención de los insectos afectará en el cálculo de la prevalencia de infección, por lo que es recomendable reportar este dato de colecta. Sobre este punto podría ser más importante tomar en cuenta solo la prevalencia de infección de insectos provenientes de dormitorios, que es donde existe el mayor riesgo de contacto e infección para la población humana.
- Es necesario presentar los valores de prevalencia con su respectivo intervalo de confianza, además de otros datos como número de dormitorios muestreados y cantidades máxima y mínima de insectos capturados. Estos datos nos pueden dar una referencia de la calidad de muestreo realizado, y así también del significado de la prevalencia de infección en una comunidad.
- La metodología para identificar a *T. cruzi* en los triatominos empleada por el Programa Nacional de Chagas, es por microscopía directa, la cual, aunque es económica, tiene algunos inconvenientes como:
  - Se deben realizar con insectos vivos o recientemente muertos, que no siempre es el caso.
  - La baja densidad del parásito puede ser indetectable
  - No todos los insectos llegan en buenas condiciones, y se termina realizando la prevalencia con pocos individuos.

Por estas falencias en la identificación de *T. cruzi*, lo cual afecta directamente a determinar la prevalencia de infección en *T. infestans*, se recomienda emplear otros métodos. En el presente trabajo se empleó una técnica molecular de PCR-multiplex, que es rápida y

sensible para la identificación de *T. cruzi* (Aliaga *et al.* 2010). Se puede emplear insectos muertos o sus deyecciones (adecuadamente conservados en etanol 70% y -20°C), y además, identifica los clones del parásito, que puede ser útil para futuros estudios.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Aliaga C., Brenière S. F. & Barnabé C. 2010. Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU. *Infection, Genetics and Evolution*. 11.
- Bar M., Oscherov B., Damborsky M., Porcel E. & Alvarez B. 1994. Interacción entre poblaciones de *Triatoma infestans* y *Triatoma sordida*. *Revista de Salud Pública*. 28: 59-68.
- Brener Z. & Alvarenga N. 1975. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the vector. New approaches in America tripanosomiasis research. Proceedings of an International Symposium, Belo Horizonte, Brasil. P.A.H.O. Scientific Publications. 318: 195-203.
- Brisse S., Barnabe C. & Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal of Parasitology*. 30: 35-44.
- Catalá S., Diotaiuti L., Pereyra M., Lorenzo M. & Gorla D. 2007. Biología de los triatominos "En: Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas". 25-59.
- Cécere M., Gürtler R., Chuit R. & Cohen J. 1997. Effects of chickens on the prevalence of infestación and population density of *Triatoma infestans* in rural houses of north-west Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*. 11: 383-388.
- Cortez M. G. 2000. Efeitos da capacitação e da terapia com ecdisona sobre a metaclicogênese do *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c em *Rhodnius prolixus*. *Fundação Oswaldo Cruz*: 37.
- Dias E. 1934. Estudios sobre o *Schyzotrypanum cruzi*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 28: 1-110.
- Dujardin J.-P., Schofield C. J. & Panzera F. 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas-Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques Bruxelles. *Academie Royale des Sciences D'Outre-Mer*: 162.



- Dumonteil E., Ramos-Ligonio A., Torres-Montero J., Dzul-Canul M., Perez-Carrillo S., Ramirez-Cierra J. & López-Monteon A. 2012. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dinidiata* from southern Mexico. "En: II Workshop internacional de la enfermedad de Chagas, vectores triatomíneos, *Trypanosoma cruzi* y *Triatoma virus*".
- Fernandes O., Devera R. & Rodrigues-Coura J. 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98: 1-12.
- Fernandes O., Santos S., Cupolillo E., Mendonca B., Derre R., Junqueira C., Santos L., Sturm N., Naiff R., Barret T., Campbell D. & Coura J. 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95: 97-99.
- García E. & Azambuja P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* in insect vector. *Parasitology Today*. 7: 240-244.
- García E. S., Gonzales M. S. & Azambuja P. 1999. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus* *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 94: 213-216
- García E. S., Ratcliffe N. A., Whitten M. M., Gonzalez M. S. & Azambuja P. 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal Insect Physiology*. 53: 11-21.
- Giojalas L. C., Catal S. S., N. A. S. & Gorla D. E. 1990. Seasonal changes in infectivity of domestic populations of *Triatoma infestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84: 439-442.
- Gonzales M. S. & Garcia E. S. 1992. Effect of azadirachtin on the development of *Trypanosoma cruzi* in different species of triatomine insect vectors: long-term and comparative studies. *Journal of Invertebrate Pathology*. 60: 201-205.

- Gorla D. E. & Schofield C. J. 1989. Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine chaco. *Medical and Veterinary Entomology*. 3: 179-194.
- Guarneri A., Diotaiuti L., Gontijo N., Gontijo A. & Pereira M. 2003. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human host. *Acta Tropica*. 87: 361-37.
- Gurevitz J. M., Ceballos L. A., Gaspe M. a. S., Alvarado-Otegui J. n. A., Enríquez G. F., Kitron U. & Gürtler R. E. 2011. Factors Affecting Infestation by *Triatoma infestans* in a Rural Area of the Humid Chaco in Argentina: A Multi-Model Inference Approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 5: 10 1-13.
- Gürtler R. E., Ceballos L., Ordóñez-Krasnowski, Lanati L., Stariolo R. & Kitron U. 2009. Strong Host-Feeding Preferences of the Vector *Triatoma infestans* Modified by Vector Density: Implications for the Epidemiology of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 3: 1-12.
- Gürtler R. E., Cécere M., Castañera M., Canale D., Lauricella M., Chuit R., Cohen J. & Segura E. 1996. Probability of infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on infected humans and dog in Northwest Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 55: 24-31.
- Gürtler R. E., Cohen J., Cecere M., Lauricelia M., Chuit R. & Segura E. 1998a. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in Northwest Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 58: 748-758.
- Gürtler R. E., Chuit R., Cécere M., Castañera M., Cohen J. & Segura E. 1998b. Household prevalence of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in three rural villages in Northwest Argentina: Environmental, demographic, and entomological associations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59: 741-749.
- Gutierrez C. 2004. Mal de Chagas en Bolivia. [www.univalle.edu/publicacones/brujula/pagina14.htm](http://www.univalle.edu/publicacones/brujula/pagina14.htm)
- Kollien A. H., Schmidt J. & Schaub G. A. 1998. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*. 70: 127-141.

- Lent H. 1948. O Genero *Rhodnius stal* (Hemiptera, Reduviidae). Revista Brasileira de Biología. 8: 297-339.
- Lent H. & Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas Disease. American Museum of Natural History. 163: 1-520.
- Lewis M., Ma J., Yeo M., Carrasco H., Llewellyn M. & Miles M. 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 81: 1041-1049.
- López A., Crocco L., Morales G. & Catalá S. 1999. Feeding frequency and nutritional status of peridomestic populations of *Triatoma infestans* from Argentina. Acta Tropica. 73: 275-281.
- Miles M. A., Souza A., Pova M., Shaw J. J., Lainson R. & Toyé P. J. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature. 272: 819-821.
- Minter-Goedbloed E. & Croon J. 1981. The insusceptibility of chickens to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 75: 350-353.
- Montes de Oca I. 2005. Enciclopedia Geográfica de Bolivia Editorial Atenea S.R.L. 871.
- Mshelbwala A. S. & Ormerod W. E. 1973. Measurement of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* in faeces of *Rhodnius* by comparison of dose-response curves. Journal of Genetic and Microbiology. 75: 339-350.
- Noireau F. & Rojas M. 2007. Los triatomínicos candidatos vectores en Bolivia. "En: Triatomínicos de Bolivia y la enfermedad de Chagas". 139-143.
- OPS. 1987. Informe de un grupo de estudio sobre estrategias de control de la enfermedad de Chagas. World Health Organization.

- Perlowagora-Szumlewicz A. & Carballo-Moreira C. 1995. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi* -1. Experimental evidence of influence of vector species on metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 89: 603-618.
- Rodríguez J. & Pinto J. C. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104: 31-40.
- Rojas M., Azambuja P., Garcia E., Brasileiro C. & Salabert M. 2007. Fisiología de Triatomíneos y su relación con el desarrollo de *Trypanosoma cruzi*. "En: Triatomíneos de Bolivia y la enfermedad de Chagas" 25-33.
- Romaña C. 1935. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanosómica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) Publicaciones MEPR. 22: 16-28.
- Salvatella R. 1995. Evolución del índice de infección tripanosómica en *Triatoma infestans* (Klug, 1834) con las acciones de control antivectorial, en dos áreas endémico chagásicas de Uruguay. Revista Médica de Uruguay. 11: 105-110.
- Schofield C. 1979. The behaviour Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): a review. Bulletin of Entomological Research. 69: 363-379.
- Schofield C. 1980. Density regulation of domestic population of *Triatoma infestans* in Brasil. Transaction of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 74: 770-778.
- Schofield C. 1985. Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale. 65: 149-164.
- Steel R. & Torrie J. 1992. Bioestadística: principios y procedimientos. McGraw-Hill. 622.
- Ursic-Bedoya R. J. & Lowenberger C. A. 2007. *Rhodnius prolixus*: Identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. Developmental and Comparative Immunology. 31: 109-120.

- Vallejo G., Suárez J., Carraza J. C., Urrea D. A., Zabala D., Guhl F., Triana O. & M. T. 2012. Interacción vector-parásito: Transmisión selectiva de genotipos de *T. cruzi* y *T. rangeli*. . “En: II Workshop internacional de la enfermedad de Chagas, vectores triatominos, *Trypanosoma cruzi* y *Triatoma virus*, Bolivia”.
- Vázquez D. P., Canale D. & Gurtler R. E. 1999. Effects of non-susceptible hosts on the infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans*: an experimental model. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 94: 3 413-419.
- WHO. 1991. Control of Chagas disease: report of a WHO expert committee. World Health Organization 104.
- WHO. 2002. Iniciativa de Salud del Cono Sur (INCOSUR): XIa Reunión de la comisión intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión. Organización Panamericana de la Salud. 129.
- WHO. 2007. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. World Health Organization. 104.
- WHO. 2011. XVIIIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Subregional Cono Sur de Eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión transfusional de la tripanosomiasis americana. Organización Panamericana de la Salud. 69.
- WHO. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. World Health Organization. 152.
- Zingales B., Andrade S., Briones M., Campbell D., Chiaris E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A., Machado C., Miles M., Romanha A., Sturm N., Tibayrenc M. & Schijman A. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 1051-1054.
-

## **ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *T. CRUZI* EN TRIATOMINOS (CTAB 2% MODIFICADO)**

1. Estimar volumen de la muestra en el tubo Eppendorf 1.5 ml.
2. Aforar a 200  $\mu$ l con PBS, adicionar 200  $\mu$ l de CTAB al 2% y homogeneizar.
3. Adicionar 20  $\mu$ l de proteinasa K 20 g/ml y vortexear a fondo por 10 segundos.
4. Incubar por 1 hora a 65°C.
5. Sacar de la incubadora, adicionar 200  $\mu$ l de cloroformo y mezclar por inversión.
6. Centrifugar por 5 min. a 12000 rpm.
7. Recuperar el sobrenadante en un tubo Eppendorf limpio.
8. Adicionar 200  $\mu$ l de isopropanol frío y mezclar por inversión.
9. Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm.
10. Desechar el sobrenadante (isopropanol) con una pipeta.
11. Adicionar 200  $\mu$ l de etanol al 70 % y centrifugar 5 min. a 12000 rpm.
12. Desechar el etanol.
13. Secar el ADN en una estufa o en una cámara de sílica gel (1 h. a 37°C) hasta que el etanol se haya evaporado.
14. Resuspender el ADN con agua tri-destilada, estimando volúmenes según la cantidad inicial de muestra.
15. Conservar el ADN a -20°C hasta su uso.

## ANEXO 2. ALEATORIZACIONES

### Muestreo aleatorio en la Comunidad de Palmarito

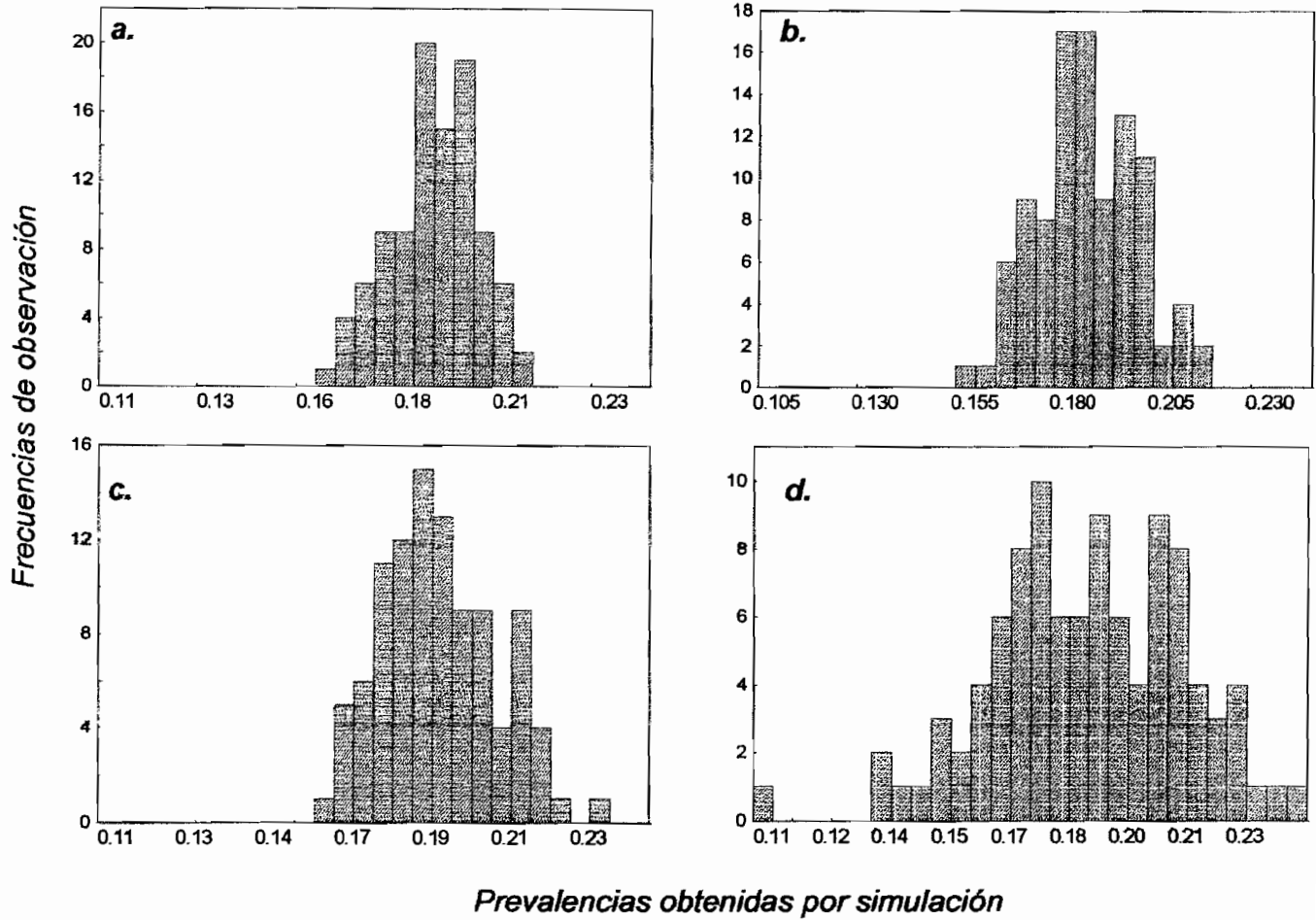


Figura 15. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para Palmarito: a. con el 50% del total de insectos, b. con el 40% de los insectos, c. con el 30% de los insectos y d. con el 20% de los insectos

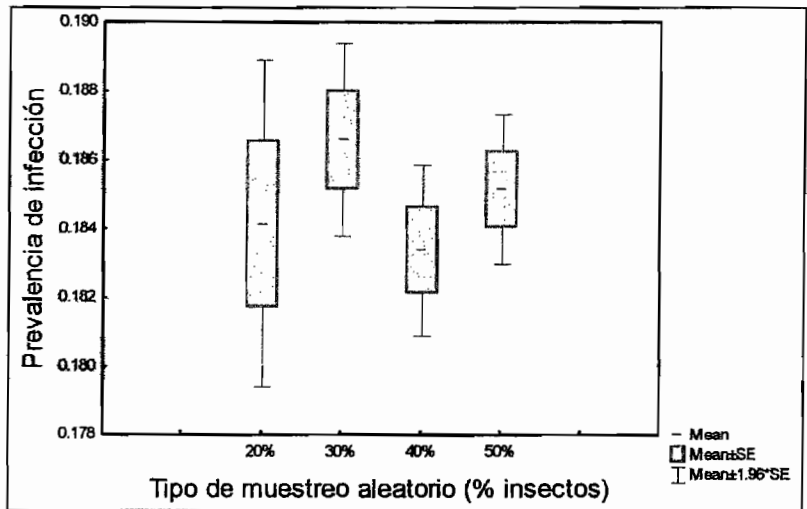
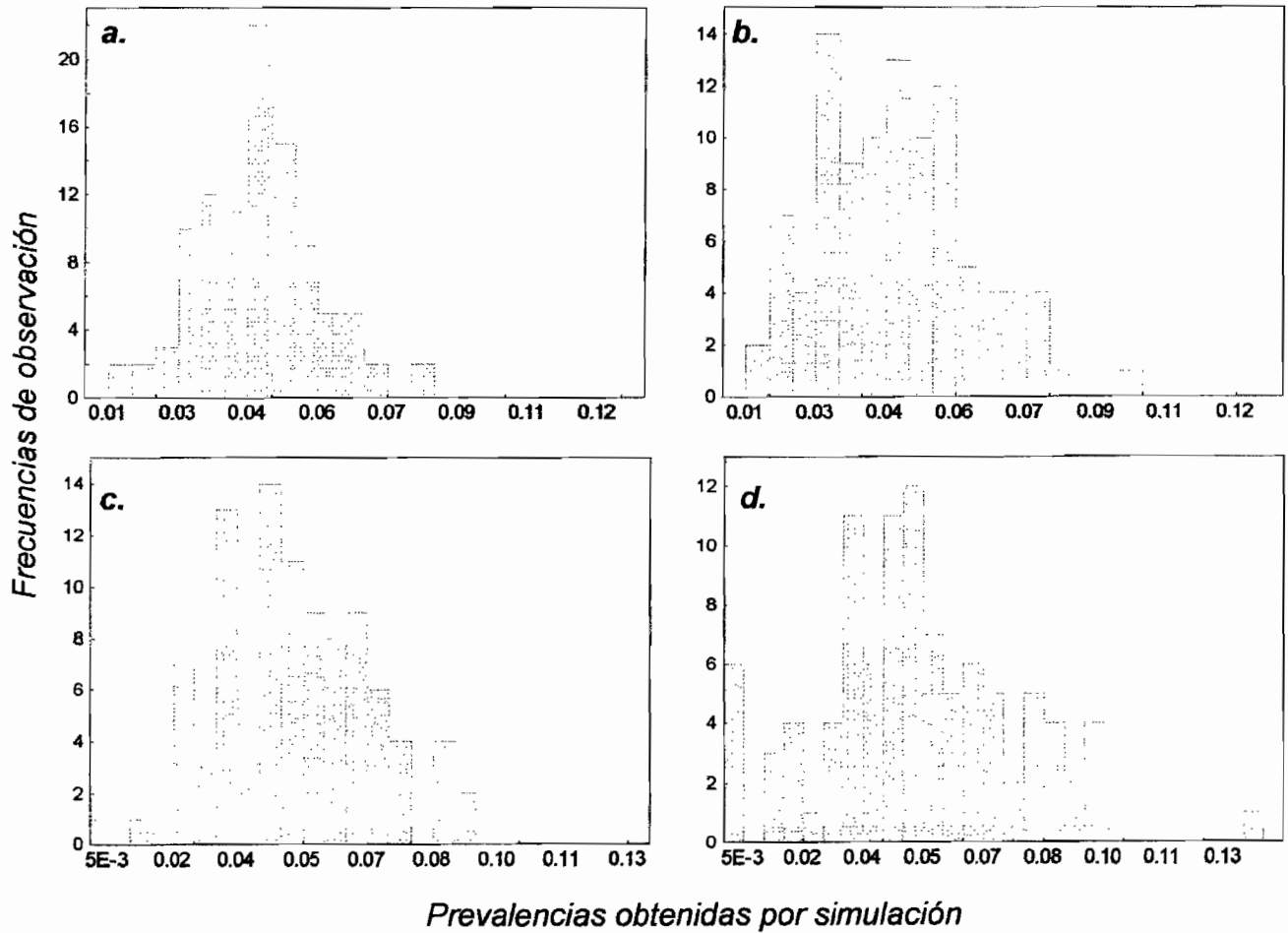


Figura 16. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en Palmarito. (IC del 95%)



## Muestreo aleatorio en la Comunidad de Lagar Pampa



**Figura 17.** Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para Lagar Pampa. *a.* con el 50% del total de insectos, *b.* con el 40% de los insectos, *c.* con el 30% de los insectos y *d.* con el 20% de los insectos.

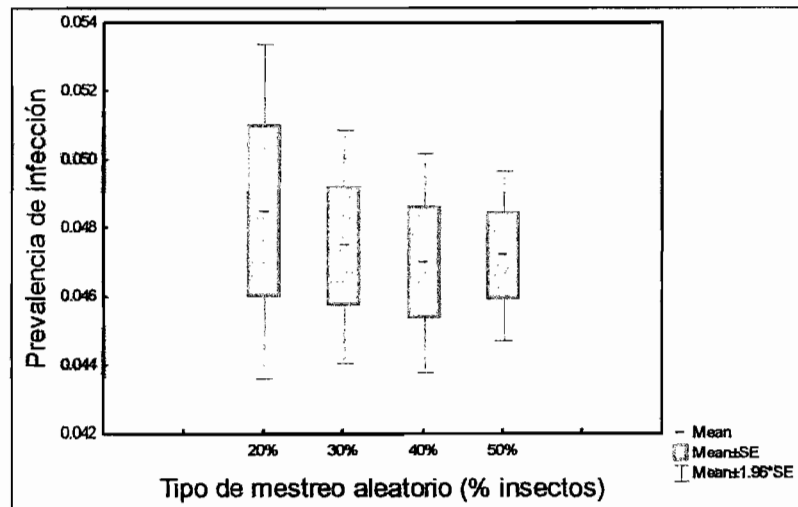
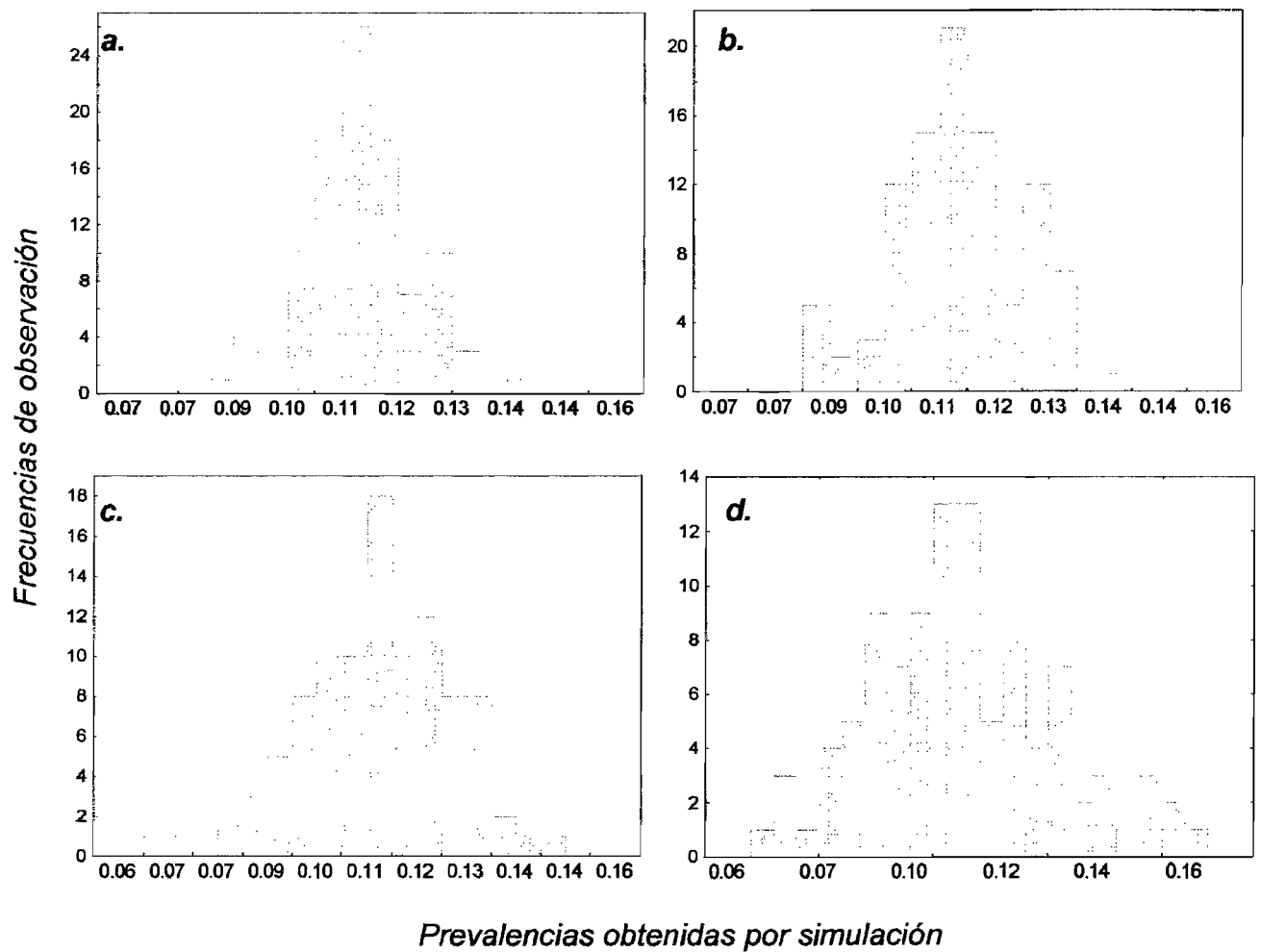
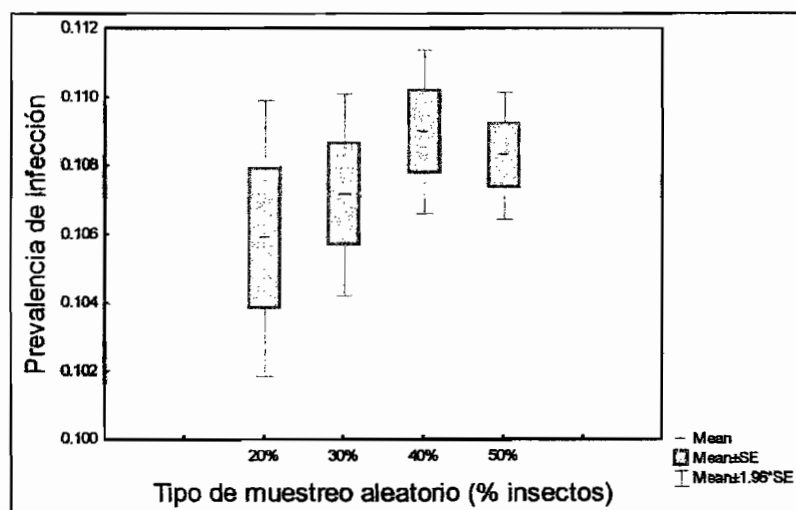


Figura 18. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en Lagar Pampa. (IC del 95%)

## Muestreo aleatorio en la Comunidad de Eje Pampa



**Figura 19.** Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria para Eje Pampa: **a.** con el 50% del total de insectos, **b.** con el 40% de los insectos, **c.** con el 30% de los insectos y **d.** con el 20% de los insectos.



**Figura 20. Variación de la prevalencia según el tamaño de muestra en Eje Pampa. (IC del 95%)**

## Muestreo estratificado en la Comunidad de Palmarito

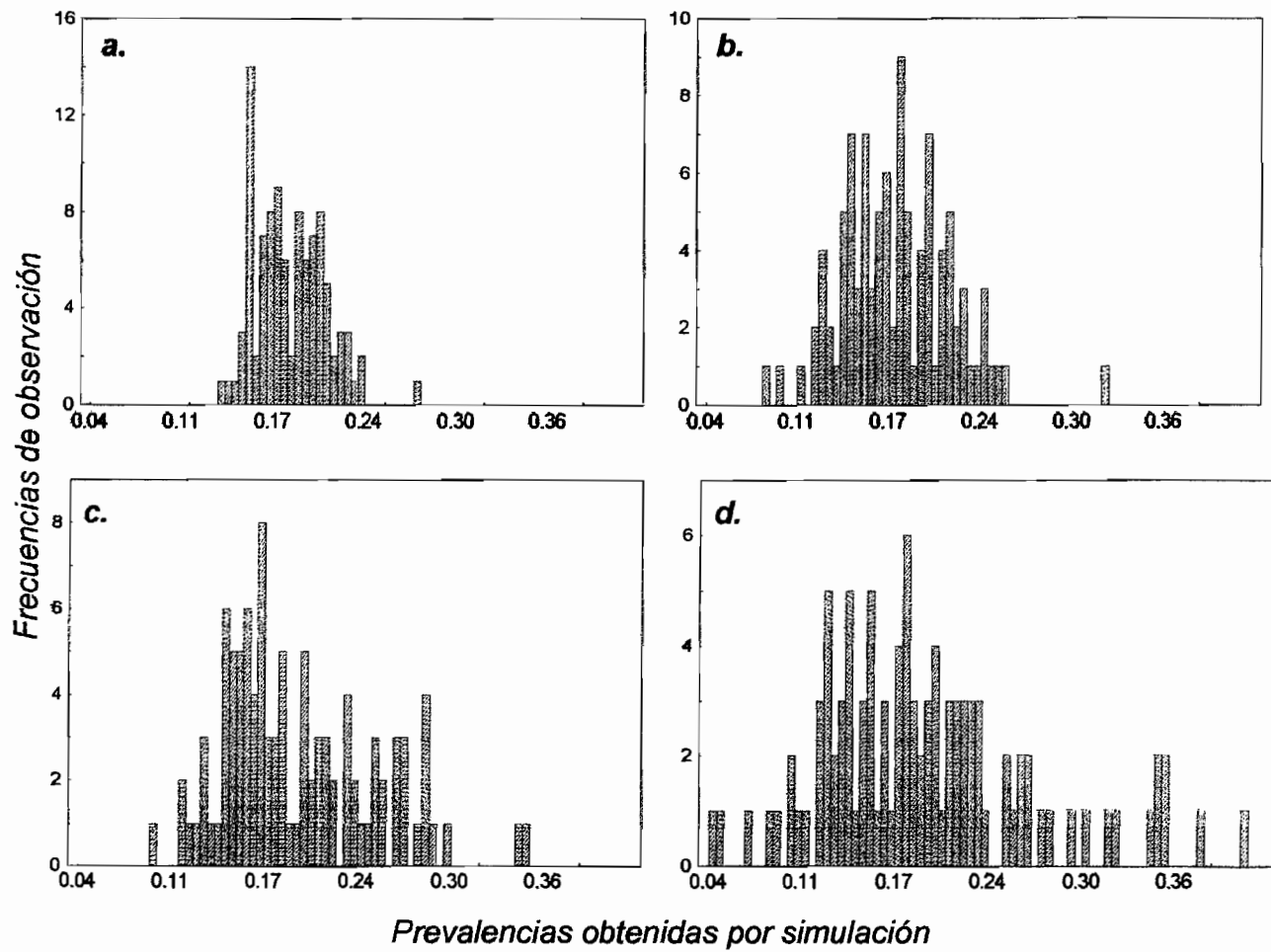
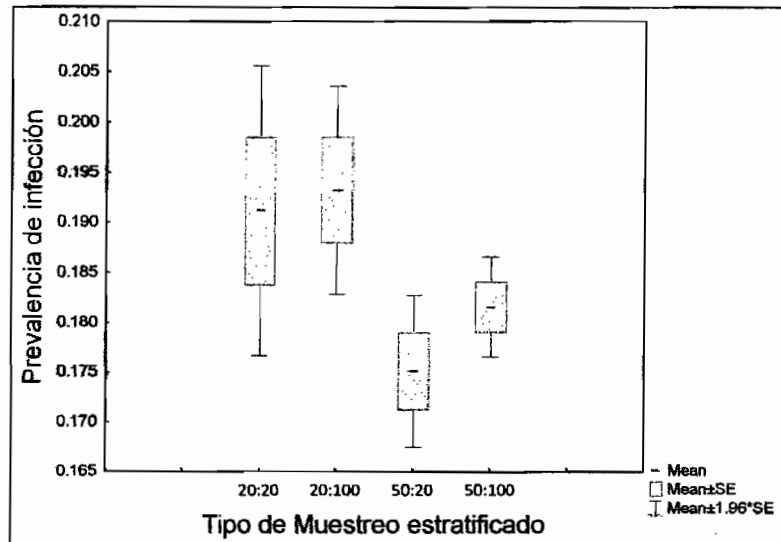
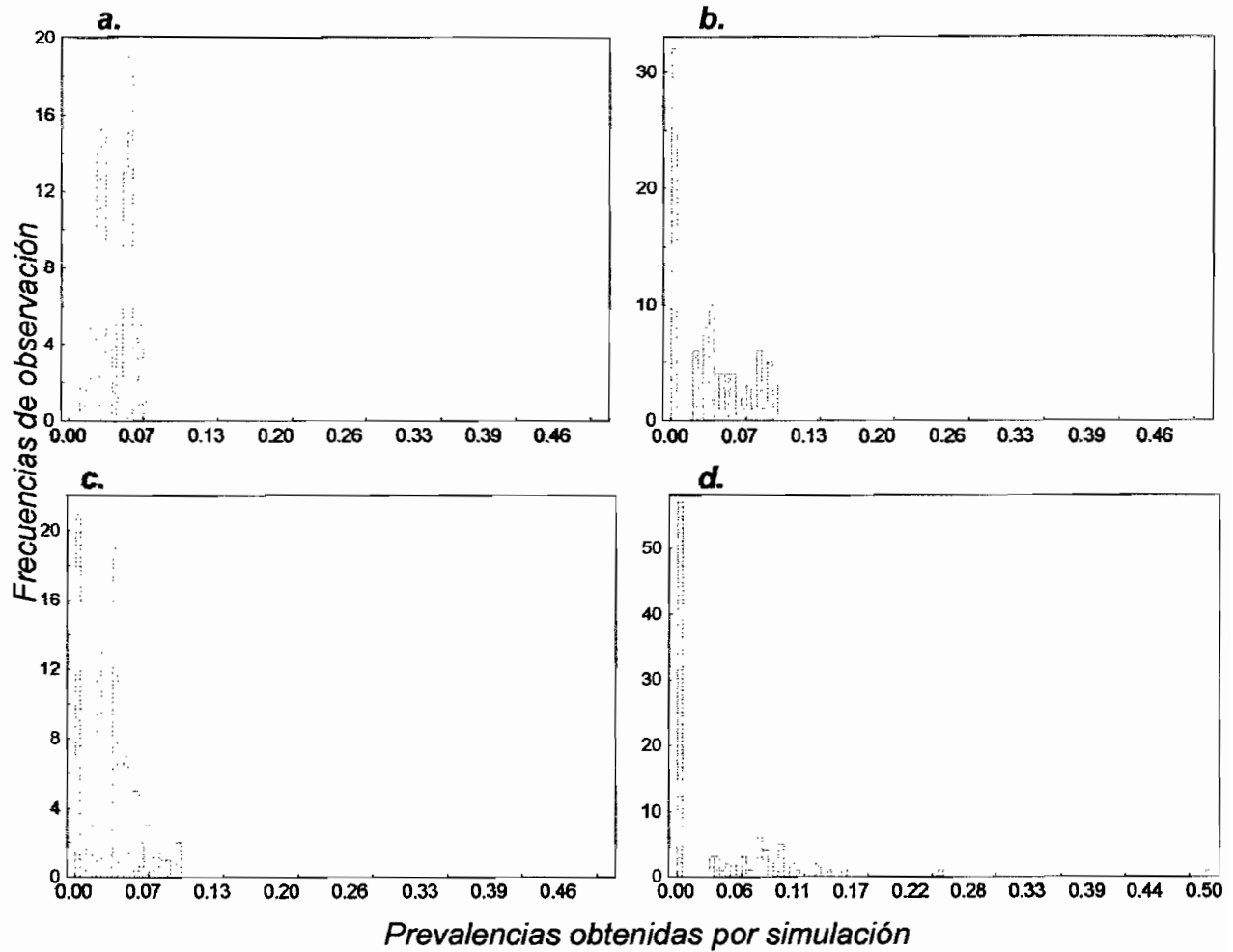


Figura 21. Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para Palmarito. *a.* simulación 50:100 (con el 100% de insectos del 50% de viviendas de la comunidad), *b.* simulación 50:20 (con el 20% de insectos del 50% de viviendas), *c.* simulación 20:100 (con el 100% de insectos del 20% de viviendas) y *d.* simulación 20:20 (con el 20% de insectos del 20% de viviendas)

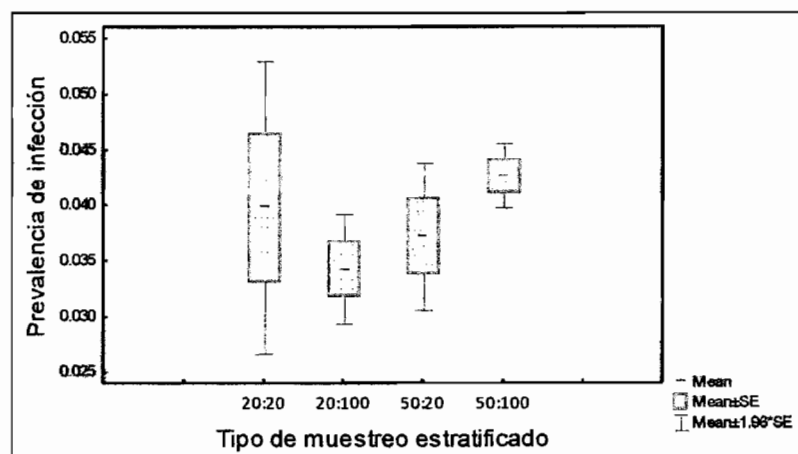


**Figura 22.** Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Palmarito. *a.* (20:20) es un muestreo del 20% del total de viviendas y de las mismas se obtiene una muestra de 20% de insectos en cada una. *b.* (20:100) muestreo del 20% de las viviendas y el total de insectos de las mismas (100%). *c.* (50:20) muestreo del 50% de las viviendas y de cada una se obtiene el 20% de insectos. *d.* (50:100) muestreo del 100% de insectos en el 50% de las viviendas de la comunidad.

## Muestreo estratificado en la Comunidad de Lagar Pampa



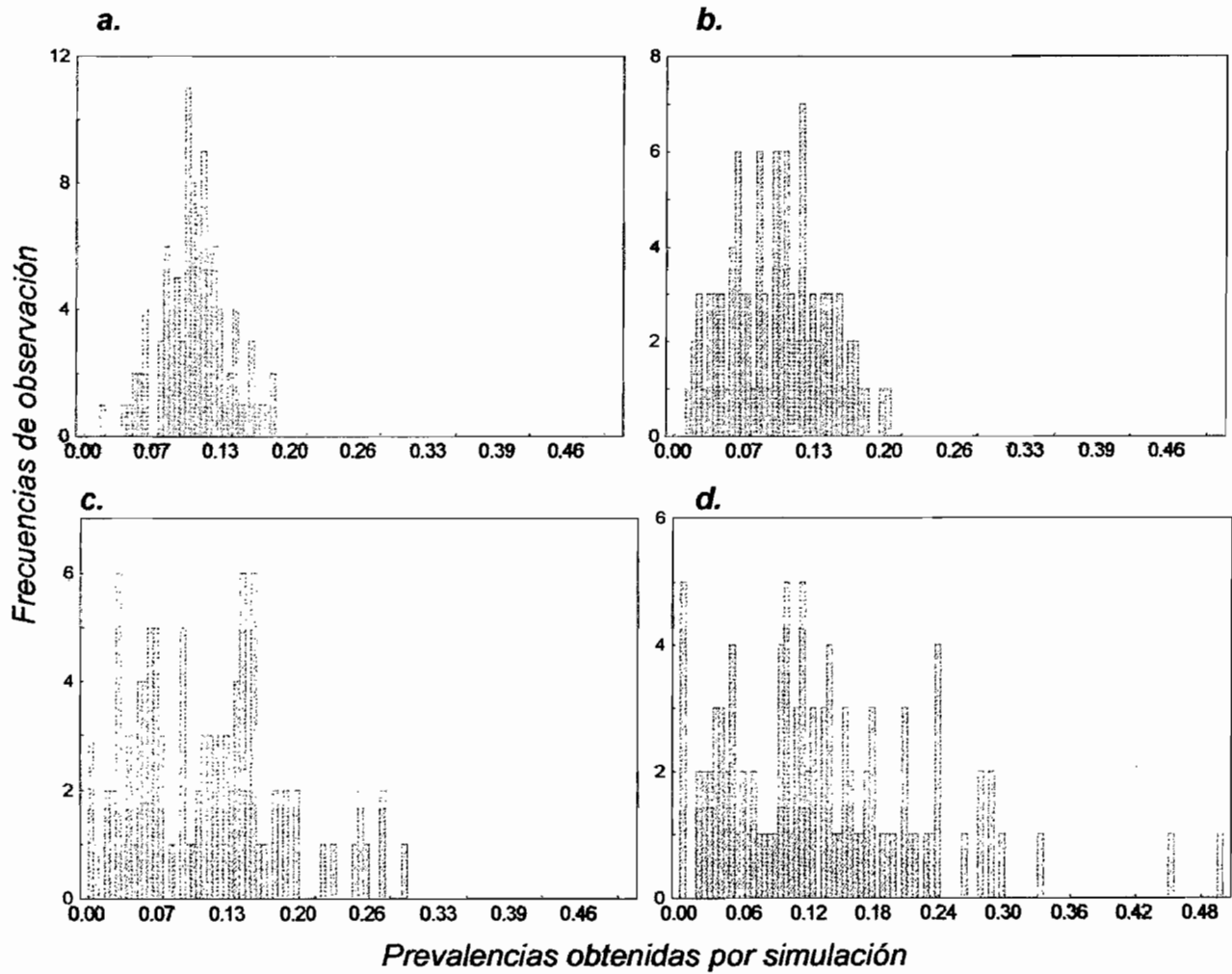
**Figura 23.** Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para Lagar Pampa. *a.* simulación 50:100 (con el 100% de insectos del 50% de viviendas de la comunidad), *b.* simulación 50:20 (con el 20% de insectos del 50% de viviendas), *c.* simulación 20:100 (con el 100% de insectos del 20% de viviendas) y *d.* simulación 20:20 (con el 20% de insectos del 20% de viviendas).



**Figura 24.** Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Lagar Pampa. *a.* (20:20) es un muestreo del 20% del total de viviendas y de las mismas se obtiene una muestra de 20% de insectos en cada una. *b.* (20:100) muestreo del 20% de las viviendas y el total de insectos de las mismas (100%). *c.* (50:20) muestreo del 50% de las viviendas y de cada una se obtiene el 20% de insectos. *d.* (50:100) muestreo del 100% de insectos en el 50% de las viviendas de la comunidad.



## Muestreo estratificado en la Comunidad de Eje Pampa



**Figura 25.** Distribución de prevalencias de infección obtenidas por simulación aleatoria estratificada para Eje Pampa. **a.** simulación 50:100 (con el 100% de insectos del 50% de viviendas de la comunidad), **b.** simulación 50:20 (con el 20% de insectos del 50% de viviendas), **c.** simulación 20:100 (con el 100% de insectos del 20% de viviendas) y **d.** simulación 20:20 (con el 20% de insectos del 20% de viviendas).



**Figura 26. Variación en la estimación de la prevalencia de infección según muestreo aleatorio estratificado en viviendas de Eje Pampa. a. (20:20) es un muestreo del 20% del total de viviendas y de las mismas se obtiene una muestra de 20% de insectos en cada una. b. (20:100) muestreo del 20% de las viviendas y el total de insectos de las mismas (100%). c. (50:20) muestreo del 50% de las viviendas y de cada una se obtiene el 20% de insectos. d. (50:100) muestreo del 100% de insectos en el 50% de las viviendas de la comunidad.**