

IDENTIFICACION DE HOSPEDEROS EN POBLACIONES DE *Triatoma dimidiata* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) DOMICILIARIAS Y EXTRADOMICILIARIAS EN SANTANDER, COMO ESTRATEGIA PARA EVALUAR SU COMPORTAMIENTO

ANA ELVIRA FARFAN GARCIA



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2007**

IDENTIFICACION DE HOSPEDEROS EN POBLACIONES DE *Triatoma dimidiata* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) DOMICILIARIAS Y EXTRADOMICILIARIAS EN SANTANDER, COMO ESTRATEGIA PARA EVALUAR SU COMPORTAMIENTO

ANA ELVIRA FARFAN GARCIA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE MAGISTER EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS

**DIRECTOR
VICTOR MANUEL ANGULO SILVA
Médico. Director CINTROP-UIS**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2007**

A Dios, por ser luz y sabiduría en mi vida

A mi esposo, por su amor incondicional, paciencia y comprensión

A mi familia, por su cariño y apoyo

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Angulo, director, de este trabajo, por su asesoría y apoyo.

Al personal del laboratorio de Entomología del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales -CINTROP- de la Universidad Industrial de Santander, por la colecta y disección de insectos.

A Yenny Castellanos y Laura Rodríguez por su colaboración en la preparación de algunos antisueros.

A compañeros de trabajo en el CINTROP por su ánimo y colaboración

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	15
1. JUSTIFICACION	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. MARCO TEORICO	22
5. METODOLOGIA	29
5.1 TIPO DE ESTUDIO	29
5.2 AREA DE ESTUDIO	29
5.3 POBLACION DE ESTUDIO	30
5.4 SELECCION DE LA MUESTRA	31
5.5 VARIABLES	32
5.6 SITIOS DE COLECTA	32
5.7 METODOS DE COLECTA Y MANEJO DE MATERIAL	33

5.8 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA	34
5.8.1 Preparación de antisueros policlonales	34
5.8.2 Titulación de antisueros policlonales	35
5.8.3 Purificación de anticuerpos no específicos	36
5.8.4 Determinación de proteínas de antisueros adsorbidos y controles	36
5.8.5 Establecimiento de diluciones mínimas de reactantes para ELISA	36
5.9 ELISA PARA LA IDENTIFICACION DE HOSPEDEROS DE <i>Triatoma dimidiata</i>	37
6. RESULTADOS	39
6.1 DISTRIBUCION DE EJEMPLARES DE <i>T. dimidiata</i> COLECTADOS EN LAS ZONAS DE ESTUDIO	39
6.2 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA	42
6.2.1 Títulos de antisueros policlonales sin absorber y absorbidos	42
6.2.2 Concentración de proteínas de antisueros policlonales absorbidos	45
6.2.3 Concentración de proteínas de los controles positivos	46
6.2.4 Títulos de los controles positivos con los antisueros absorbidos	47
6.2.5 Optimización del ELISA para la identificación de hospederos	48

6.3 HOSPEDEROS DE <i>T. dimidiata</i>	49
7. DISCUSION	59
8. CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS	84

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Distribución de <i>Triatoma dimidiata</i> por veredas	39
Tabla 2. Concentración de proteínas de los antisueros absorbidos	46
Tabla 3. Concentración de proteínas en mg/ml de los controles positivos	47
Tabla 4. Hospederos domésticos y silvestres de <i>T. dimidiata</i> identificados en poblaciones de <i>T. dimidiata</i> en la zona de estudio	50
Tabla 5. Hospederos identificados en 367 ejemplares de <i>T. dimidiata</i> en la zona de estudio	51
Tabla 6. Distribución de hospederos de <i>T. dimidiata</i> entre los insectos positivos por ELISA	53
Tabla 7. Frecuencias observadas y esperadas de los insectos reactivos en el ELISA para diferentes hospederos en los tres hábitats de estudio	54
Tabla 8. Alimentaciones múltiples detectadas en las poblaciones de <i>T. dimidiata</i> en la zona de estudio	56
Tabla 9. Distribución de hospederos de <i>T. dimidiata</i> por estadios de desarrollo en la zona de estudio	58

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Mapa con la distribución de <i>Triatoma dimidiata</i> en Santander	30
Figura 2. Panorámica de la zona de estudio	31
Figura 3. Ejemplares de <i>T. dimidiata</i> colectados en la zona de estudio	31
Figura 4. Hábitats de la zona de estudio	32
Figura 5. Trampa con cebo animal para colecta de insectos silvestres	33
Figura 6. Producción de antisueros policlonales en conejos	35
Figura 7. Alimentación de ninfas de V estadio de <i>Rhodnius prolixus</i> sobre opossum anestesiado	37
Figura 8. Hábitats peridomiciliarios	40
Figura 9 Trampas con cebo animal (gallinas) positivas	41
Figura 10. Distribución de estadios evolutivos de <i>T. dimidiata</i> colectados en la zona de estudio	42
Figura 11. Distribución de los títulos de los antisueros sin absorber y absorbidos	43
Figura 12. Curvas de titulación de antisueros no absorbidos	44
Figura 13. Curvas de titulación de los antisueros absorbidos	45
Figura 14. Títulos de los antisueros absorbidos frente a los controles positivos	48
Figura 15. Reactividad obtenida por ELISA con contenidos intestinales de <i>R. prolixus</i> (diez controles positivos) ante los antisueros homólogos y heterólogos	49
Figura 16. Alimentaciones mixtas de <i>T. dimidiata</i> en la zona de estudio	55

Figura 17. Curva de calibración de proteínas 0,025-1 mg/ml	85
Figura 18. Curva de calibración de proteínas 1-30 μ g/ml	86
Figura 19. Curva de calibración de proteínas 40-100 μ g/ml	87

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Titulación de antisueros mediante ELISA	81
Anexo B. Purificación de antisueros policlonales	82
Anexo C. Curva de calibración de proteínas	84
Anexo D. ELISA para detección de hospederos de <i>T. dimidiata</i>	88

RESUMEN

TITULO: IDENTIFICACION DE HOSPEDEROS EN POBLACIONES DE *Triatoma dimidiata* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) DOMICILIARIAS Y EXTRADOMICILIARIAS EN SANTANDER, COMO ESTRATEGIA PARA EVALUAR SU COMPORTAMIENTO*

AUTOR: Ana Elvira Farfán García**

PALABRAS CLAVES: *Triatoma dimidiata*, hospederos, preferencias alimentarias, ELISA, Enfermedad de Chagas.

DESCRIPCION O CONTENIDO

Introducción. *Triatoma dimidiata*, vector secundario de *Trypanosoma cruzi* es de amplia distribución en Centro y Norte de Sur América. La determinación de sus hospederos ofrece información sobre la dinámica de dispersión y movilidad entre sus hábitat y es indispensable para la comprensión de la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

Objetivo. Identificar los hospederos de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) de hábitats domiciliarios y extradomiciliarios en Santander.

Materiales y métodos. Un total de 367 contenidos intestinales de especímenes de *T. dimidiata* colectados en domicilio (135), peridomicilio (141), silvestre (91), en áreas rurales de Macaravita y Capitanejo en el período 2002-2007, fueron procesados con la técnica de ELISA estandarizada para este estudio, para determinar sus preferencias alimentarias, utilizando doce antiseros específicos: humano, *Dasypus albiventris* (armadillo), *Didelphis marsupialis* (opossum), *Rattus rattus* (rata), ave, gato, canino, bovino, caprino, ovino, equino y porcino.

Resultados. En 155 (42,2 %) de los insectos analizados se identificaron proteínas sanguíneas para uno o más hospederos. Una mayor y significativa frecuencia de alimentaciones en animales domésticos fue observada en los insectos de los diferentes hábitats; animales silvestres también fueron detectados en menor frecuencia. Gallina con 40,6 % fue el hospedero más frecuente ($P<0,05$), seguido de cabra (34,8 %) ($P<0,05$) y canino (18,7 %) ($P<0,05$), los demás presentaron proporciones menores a 20 %. El hospedero humano fue detectado en 31,4 % de los insectos del hábitat doméstico.

Conclusiones. *T. dimidiata* presenta amplio espectro de hospederos y preferencia por animales domésticos, probablemente por mayor disponibilidad de éstos en la zona de estudio. El hallazgo de sangre de animales domésticos en los insectos colectados hábitats silvestres y de silvestres en los del domicilio y peridomicilio sugiere movilidad de las poblaciones entre estos hábitats aumentando el riesgo de transmisión de *T. cruzi*.

*Proyecto de grado

**Facultad de Salud. Escuela de Medicina, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Dr. Víctor Manuel Angulo Silva Md. UIS. Director CINTROP-UIS

ABSTRACT

TITLE: HOST'S IDENTIFICATION IN POPULATIONS OF *Triatoma dimidiata* (HEMIPTERAN: REDUVIIDAE) DOMICILIARY AND EXTRADOMICILIARY IN SANTANDER, LIKE STRATEGY TO EVALUATE HIS BEHAVIOR*

AUTORA: Ana Elvira Farfán García**

KEY WORDS: *Triatoma dimidiata*, hosts, feeding preferences, ELISA, Chagas disease, habitats

DESCRIPTION OR CONTENTS

Introduction. *Triatoma dimidiata*, secondary vector of *Trypanosoma cruzi*, is from extensive distribution in Center and North of South America. His host determination offers information on the dynamics of dispersion and mobility among his habitat and it's indispensable for the understanding of the epidemiology of Chagas' disease.

Objective. To identify host of *T. dimidiata* (Hemipteran: Reduviidae) of domiciliary and extradomiciliary habitats in Santander.

Materials and methods. A total of 367 intestinal contents of specimens of *T. dimidiata* collected at domicile (135), peridomicile (141), wild (91), in rural of Macaravita and Capitanejo areas in the period 2002-2007, were processed with the technique of ELISA standardized for this study, to determine his feeding preferences, utilizing twelve specific anti-serums: Human, *Dasyus albiventris* (armadillo), *Didelphis marsupialis* (opossum), *Rattus rattus* (rat), bird, cat, canine, bovine, goat, ovine, equine and porcine.

Results. In 155 (42,2 %) of examined insects they identified sanguine proteins for one or more hosts. A bigger and significant frequency of feeding in domestic animals was observed in the insects of different habitats; the wild animals also were detected in younger frequency. The hen with 40,6 % was the more frequent host ($p < 0,05$), followed of goat (34.8 %) ($P < 0,05$) and the canine (18,7 %) ($P < 0,05$), the other ones presented younger proportions to 20 %. The human host was detected in 31.4 % of the insects of the domestic habitat.

Conclusions. *T. dimidiata* presents ample hosts spectrum and preference for domestics animals, probably for bigger availability of these at the survey area. The domestics animals finding of blood in collected insects wild habitats and of wild in the ones belonging to the domicile and peridomicile suggests mobility of populations among these habitats increasing the risk of transmission of *T. cruzi*

*Grade project

**Faculty of Health. School of Medicine, Master in Basic Biomedical Sciences. Víctor Manuel Angulo Silva Md. UIS Director. CINTROP-UIS Director.

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas actualmente continúa siendo un serio problema de salud pública en Latinoamérica; aproximadamente 10 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi* y 40 millones en riesgo de infección (Schofield et al., 2006).

Triatoma dimidiata (Latreille) (Hemiptera:Reduviidae), uno de los principales vectores de la Enfermedad de Chagas, se distribuye en la mayoría de los países de América Central, algunas zonas de Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (Schofield, 1994, 2000; Moncayo, 2003; Ponce, 2007); ocupa una amplia diversidad de hábitats domésticos, peridomésticos y selváticos tanto en áreas rurales, como en viviendas periurbanas y urbanas de poblaciones pequeñas y grandes ciudades (Zeledón, 2001a).

En Latinoamérica esfuerzos en el control vectorial, exitosos en la mayoría de los casos, han sido enfocados en la erradicación de triatomíneos domiciliados, especialmente, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*; con *T. dimidiata*, se ha observado que insectos silvestres recolonizan las viviendas después del tratamiento con insecticidas y para el diseño de estrategias de control efectivas es necesario conocer si los que reaparecen luego de la fumigación son poblaciones residuales o corresponden a nuevas infestaciones (Dorn et al., 2003; Nakagawa et al., 2003; Hashimoto et al., 2006).

Los estudios realizados con esta especie en Colombia, se han limitado a su distribución, factores de riesgo para la infestación domiciliaria y a su susceptibilidad frente a insecticidas particulares (Angulo et al., 1999; Reyes et al., 2007). Conocer los patrones alimentarios de poblaciones de *T. dimidiata* es indispensable para obtener información sobre su biología, comportamiento, dinámica de dispersión y potencial adaptación a diferentes hábitats y hospederos, especialmente los que tienen hábitats extradomiciliarios, para encontrar la forma de controlar los vectores que invaden las viviendas postratamiento.

Con el objetivo de identificar los hospederos de *T. dimidiata* y evaluar su comportamiento, se realizó este trabajo en poblaciones de hábitats domiciliarios y extradomiciliarios en una zona endémica de Santander, Colombia.

1. JUSTIFICACION

En Colombia, el primer estudio de cubrimiento nacional en la encuesta nacional de 1976-1980 para la Enfermedad de Chagas mostró que la población afectada alcanzó el 3.3% y alrededor del 10% de la población habitaba en zonas de riesgo, con una prevalencia de *R. prolixus* domiciliado en 15 departamentos; *T. dimidiata* fue registrado como el segundo triatomino domiciliado en frecuencia, distribuido en cuatro departamentos (Corredor et al, 1990). Sin embargo dos décadas después es reportado en 15 departamentos y 75 municipios, con alta distribución en Santander, Boyacá y Cesar, seguida de la sierra Nevada de Santa Marta y los Llanos Orientales (Angulo, 2005a,b; Guhl et al., 2007).

R. prolixus aún sigue siendo el principal vector de *T. cruzi* en el país, y es el blanco en las campañas de control químico; no obstante, poblaciones extradomiciliarias de *T. dimidiata* merecen especial atención, porque pueden ser fuente de reinfestaciones, con o sin completa domiciliación, debido a su gran capacidad de dispersión y tendencia a ocupar diferentes hábitats, aumentando el riesgo para la transmisión del parásito a humanos (Angulo et al., 1997, 1999; Guhl & Vallejo, 1999).

Los estudios de infestación domiciliaria realizadas por investigadores del CINTROP desde 1996, en el departamento de Santander, muestran que *T. dimidiata* se distribuye en áreas rurales de 21 municipios con altas tasas de infección por *T. cruzi* (Angulo, 2005a). Además, frecuentemente invade viviendas urbanas en buen estado, como es el caso de los municipios de San Joaquín y Onzaga, donde se registraron 78 viviendas infestadas, con altas tasas de infección por *T. cruzi*. (Angulo et al., 1997; Angulo, 2005a).

Los resultados de estos trabajos específicamente en los municipios de Macaravita y Capitanejo, han revelado promedios de proporciones de infestación de 22 % y de infección natural por *T. cruzi* cercanas al 20 %, mostrando a *T. dimidiata* como el triatomino de mayor dispersión en la zona con elevada prevalencia de infestación post-tratamiento con insecticidas.

Esta situación epidemiológica que muestra la creciente dispersión de *T. dimidiata* de un insecto del cual poco se conoce su biología y comportamiento, conduce al uso de estrategias para su estudio. Una de estas estrategias para entender la bionómica de los triatominos en los diferentes hábitats, es la identificación de los hospederos que éstos utilizan como fuente de alimentación, pues clarifica aspectos de su movilidad entre hábitats y del ciclo de transmisión (Goncalves et al., 2000; Vasquez et al., 1999), proporcionando información sobre su radio de dispersión, distribución y estado nutricional (Gurtler et al., 1998; Christensen, 1988; Calderón-Arguedas et al., 2001; Zeledón et al., 1973, 2005; Quintal & Polanco, 1977).

Adicionalmente, esta herramienta ofrece valiosa información sobre la emergencia de vectores no domiciliados o en proceso de domiciliación como *Panstrongylus megistus* (Correa Rodrigues et al., 1992), *Triatoma vitticeps* (Goncalves et al., 2000; Lorosa et al., 2003), *T. brasiliensis* (Costa et al., 2003; Sarquis et al., 2006) y *T. pseudomaculata* en Brasil (Sarquis et al., 2006), *Rhodnius ecuadoriensis* (Abad-Franch et al., 2002) en Ecuador, *T. dimidiata* en Colombia y Centro América (Schofield et al., 1999; Zeledón et al., 2005), *R. prolixus* de palmas (D'Alessandro et al., 1984; Angulo et al., 2006b) y *Belminus herreri* colectados en domicilio en Colombia (Sandoval et al., 2004), cuya significación epidemiológica en el ciclo de transmisión es necesario determinar. El conocimiento de los patrones alimentarios de estos vectores contribuye notablemente a replantear y reorientar las actividades de control y vigilancia en las zonas endémicas para la Enfermedad de Chagas.

En Colombia no existen trabajos sobre aspectos bio-ecológicos y de comportamiento de *T. dimidiata* relacionados con sus hospederos en hábitats domiciliarios y extradomiciliarios; la aplicación de esta metodología en poblaciones de *T. dimidiata* permitirá conocer las asociaciones existentes entre éstos y su grado de movilidad, así como la estrecha relación con la transmisión de *T. cruzi* al hombre.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han descrito más de 130 especies vectores o potenciales vectores para la Enfermedad de Chagas, dentro de las que se destacan *T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. maculata*, *T. sordida*, *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. pallescens* y *P. megistus*.

El conocimiento de la ecología de algunas de estas especies aún es inconcluso, principalmente porque la mayoría de los estudios han sido enfocados hacia las especies domiciliadas, blanco para el control (Cruz-López et al., 2001). Algunos de estos triatomíneos se han adaptado muy bien al domicilio o están en proceso de domiciliación, mientras otros se encuentran asociados a ecótopos peridomésticos y/o silvestres (Gaunt & Miles 2000; Dumonteil et al., 2002).

T. dimidiata, especie distribuida en países de Centro y Norte de Suramérica, tiene importancia epidemiológica por su amplia dispersión en hábitats intra y extradomiciliarios y por su participación activa en la transmisión de *T. cruzi* a humanos (Zeledón et al., 2001b, 2005; Zeledón & Rojas, 2006; Monroy et al., 2003a; Ponce, 2007; Dorn et al., 2007).

R. prolixus procedente de palmas de Venezuela y Colombia incursiona en viviendas fumigadas aumentando el riesgo de infección humana (Feliciangeli et al., 2007; Angulo & Esteban, 2007). En los países del cono sur la interrupción de la transmisión de *T. cruzi* está enfocada en la eliminación de los vectores domésticos, particularmente *T. infestans* (Schofield et al., 2006); sin embargo existe una progresiva información sobre la invasión activa o pasiva del domicilio por triatomíneos silvestres como *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. vitticeps* y *P. megistus* (Noireau et al., 1997; Costa et al., 2003; Borges et al., 2005; Lorosa et al., 2003; Villela et al., 2005; de Oliveira & da Silva, 2007).

R. prolixus, *P. megistus* y *T. dimidiata* se conocen por su carácter eurifágico (Angulo et al., 2006; Zeledón et al., 2005; Zeledón & Rojas, 2006; Forattini et al., 1982), situación que favorecería su incursión al ambiente doméstico y peridoméstico en busca de hospederos.

La constante disminución de refugios y hospederos de los triatomíneos silvestres, como resultado de la degradación del hábitat por la deforestación y perturbación

de la vegetación nativa o su reemplazo por cultivos y pastos, que sumado a las características de las viviendas, permiten su colonización y han sido señalados como las principales causas para la domiciliación de triatominos (D'Alessandro et al., 1984; Gurgel-Goncalves et al., 2004; Gaunt & Miles, 2000; Dumonteil & Gourbiere, 2004).

T. dimidiata es una especie de carácter silvestre que frecuenta el domicilio humano y se encuentra principalmente en ecótopos con variadas condiciones ecológicas. Se distribuye desde climas áridos a 10 msnm hasta zonas frías a 2.700 msnm, mostrando potencial adaptación a ecótopos domiciliarios y extradomiciliarios, con comportamientos eurixénicos (Zeledón et al., 2001b; Monroy et al., 2003a; Schofield, 1994; Angulo 2005a; Dorn et al., 2007). Este insecto exhibe una tendencia hacia áreas urbanas y periurbanas de localidades pequeñas, incluso algunas ciudades (Zeledón et al., 1973), estableciéndose principalmente en viviendas con pobres condiciones sanitarias.

En los domicilios rurales, los insectos se localizan principalmente en las paredes de adobe o bahareque de las habitaciones, cerca de las camas, detrás de los cuadros o afiches o en objetos acumulados de diferentes clases, no sobrepasando una o dos docenas de individuos en la vivienda (Zeledón et al., 2001a; Angulo et al., 2004). También se ha observado en los pisos de tierra en donde las ninfas camuflan sus cuerpos con detritos evitando su detección (Starr et al., 1991) y adultos de *T. dimidiata* no domiciliados incursionan a las viviendas en la noche atraídos o desorientados por la luz (Zeledón et al., 2001b, Monroy et al., 2003b).

Los ecótopos peridomiciliarios ofrecen excelentes refugios para animales domésticos y sinantrópicos, permitiendo la formación de colonias de triatominos. Estos sitios son fácilmente colonizados por los insectos y corresponden a patios, cercas de madera o piedra, corrales de ganado, acúmulos de piedras o madera, cocheras, gallineros, trapiches, conejeras, caneyes, etc., que se encuentran muy cerca de las viviendas y en ellos se ubican gran cantidad de hospederos que reposan o descansan, siendo fuentes alimentarias potenciales para los insectos (Angulo, 2005a).

T. dimidiata mantiene ciclos enzoóticos involucrando mamíferos silvestres, alimentándose de la sangre de los animales que habitan en esos lugares. Sus ecótopos, están especialmente asociados con madrigueras de mamíferos, sitios de reposo de marsupiales como el opossum, nidos, cuevas de murciélagos y roedores, acúmulos de rocas, huecos de árboles y palmas. En algunas regiones estos ecótopos silvestres están cerca de las viviendas y los insectos pueden

invadir el domicilio y/o peridomicilio activa o pasivamente (Zeledón et al., 2001a; Arroyo et al., 2007; Angulo, 2005b).

El constante hallazgo de sangre de oposum (*Didelphis marsupialis*) en el intestino de los insectos encontrados alrededor de las casas, explica las altas tasas de infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi* (Zeledón et al., 2005; Calderón-Arguedas et al., 2001), indicando la relación que existe entre el ciclo doméstico y silvestre del parásito involucrando el mismo vector.

Poblaciones de *T. dimidiata*, presumiblemente de origen silvestre, continuamente invaden ecótopos artificiales de viejos o nuevos domicilios, con parcial o completo éxito en su domiciliación. Las gallinas y caninos en sus resguardos son frecuentemente los primeros hospederos utilizados para su alimentación (Zeledón et al., 2005).

Existe poco conocimiento de la biología de este insecto y de su comportamiento en los diferentes hábitats, a pesar de su progresiva importancia como vector de *T. cruzi* en Colombia. Algunos trabajos de Centroamérica, especialmente en Costa Rica, utilizando la identificación de hospederos, han sido los más aproximados para conocer aspectos biológicos de esta especie y sugieren que las poblaciones peridomiciliarias se mueven al intradomicilio. Además, se ha observado la frecuente entrada de adultos volando al domicilio probablemente de origen silvestre (Zeledón et al., 2005).

La anterior situación es similar a la de las poblaciones de *T. dimidiata* de Macaravita y Capitanejo en Santander, que origina varias preguntas sobre su comportamiento: ¿Cuál es la procedencia de los insectos intra y peridomiciliarios? ¿Son poblaciones silvestres? ¿Son los insectos de estos hábitats extradomiciliarios fuente de infestaciones domiciliarias? ¿Cuál es la preferencia alimentaria de *T. dimidiata* en cada uno de esos hábitats? ¿Existe movilidad entre las poblaciones de estos hábitats? ¿La identificación de sus hospederos nos permite conocer su procedencia?

La ejecución de este trabajo permite hacer una aproximación al conocimiento del comportamiento de las poblaciones de *T. dimidiata* en diferentes hábitats de la zona de estudio. La determinación de sus hospederos, brinda información sobre su grado de movilidad, conocimiento nuevo para la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Colombia, pues ayuda a comprender la infestación domiciliar por estas poblaciones, así como sus posibles implicaciones en la transmisión de *T. cruzi* en las zonas endémicas.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar los hospederos de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) de hábitats domiciliarios y extradomiciliarios en Santander.

4. MARCO TEORICO

T. dimidiata (Latreille, 1811), segundo vector de *T. cruzi* en Colombia, no es estrictamente domiciliado, pues exhibe una compleja distribución en ecótopos domésticos, peridomésticos y silvestres (Guhl et al., 2007; Angulo, 2005a; Angulo et al., 2006). Presenta dificultades para el control por su diversidad de hábitats silvestres, su capacidad de invasión, dispersión y de recolonización.

T. dimidiata en los hábitats que ocupa, presenta carácter ecléctico con un amplio rango de hospederos tanto silvestres como domésticos, incluyendo el hombre. Su domiciliación ha sido relacionada con la presencia y densidad de animales en lugares de reposo alrededor de la vivienda, el área de ésta y con el número de habitantes humanos, más que con las características de techos, paredes y pisos (Angulo, 2005b). La movilidad y dispersión de estos insectos es evidenciada por el hallazgo de sangre humana y de animales silvestres en los insectos colectados en ambientes domésticos y peridomésticos.

La alimentación es un factor que afecta la dinámica poblacional de los triatominos, determinando diferencias en características de su movilidad y dispersión. Diversos estudios epidemiológicos han involucrado la identificación de los hospederos mediante la investigación de los patrones alimentarios en diversas especies de estos vectores, cuyos resultados muestran características de comportamiento en diferentes hábitats con implicaciones epidemiológicas en la transmisión de *T. cruzi*.

Para su estudio, han sido empleadas diferentes metodologías como las técnicas serológicas, especialmente, el test de precipitinas, que fueron usadas por primera vez por Romaña en 1939 (Romaña, 1939). A partir de los años 60 se intensificó la búsqueda de métodos rápidos, prácticos, sensibles y específicos que brindaran datos confiables sobre las fuentes sanguíneas detectadas (Siqueira, 1960).

Las pruebas inmunológicas como test de precipitinas en tubo capilar, el test de inmunodifusión doble de Outchterlony en agar, reacciones de hemaglutinación, presentan dificultades como la baja sensibilidad, la necesidad de una gran cantidad de material biológico y un criterio de interpretación de los resultados

bastante subjetivo; las dos primeras han sido las más utilizadas en diversos estudios (Almeida et al., 2002; Abad-Franch et al., 2002; Lorosa et al., 2003; Vasquez et al., 2004; Zeledón et al., 2005; Freitas et al., 2005).

La inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos específicos anti-membrana de glóbulos rojos de diferentes hospederos y conjugados con fluoresceína o rodamina se introdujeron como métodos alternativos, pero con resultados poco satisfactorios debido al equipo sofisticado y con criterios de lectura bastante subjetivos (McKinney et al., 1972)

Recientemente, las pruebas moleculares para estudios en triatominos y dípteros (Bosseno et al., 2006; Kent & Norris, 2005; Boakie et al., 1999) y el inmunoensayo enzimático “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) (Voller et al., 1976), adaptado para estos estudios en 1981 (Burkot et al., 1981), han mostrado ser superiores en sensibilidad, especificidad y confiabilidad comparadas principalmente con el test de precipitinas (Duarte, 1997).

El ELISA ha sido ampliamente utilizado para inmunodiagnóstico de diferentes enfermedades, sus métodos y equipos son de amplio uso en la mayoría de los países y ha sido empleado para la identificación de las fuentes sanguíneas en diferentes insectos, como estrategia para conocer aspectos epidemiológicos de enfermedades de importancia en salud pública (Burkot et al., 1981; Gomes et al., 2001; Svobodova et al., 2003; Sandoval et al., 2004; Duarte, 1997; Feliciangeli et al., 2004).

Utilizando esta metodología en uno de los primeros estudios llevados a cabo en Brasil con varias especies de triatominos domiciliados se detectaron proteínas sanguíneas de aves y humanos (54,8 % y 30%) por el método de inmunodifusión en gel; *P. megistus*, especie más prevalente y en proceso de domiciliación, mostró amplio eclecticismo alimentar, principalmente sobre marsupial, humano, gato, perro y roedores (Forattini et al., 1981).

Un trabajo posterior, en poblaciones de la misma especie, en la región administrativa de Campinas, Brasil, reveló que 14,9 % de adultos y ninfas colectados en ecótopos domiciliarios fueron reactivas para sangre humana; valores más altos se observaron para aves, marsupiales y roedores (64,3 %, 36,3 % y 22,8 %) en los ecótopos extradomiciliarios. El hallazgo de sangre humana

evidenció procesos de domiciliación del vector que sumado a la infección natural con *T. cruzi* (14,7%), se señala como un factor de riesgo para el hombre (Correa Rodrigues et al., 1992).

En este mismo país, entre 1985 y 1992, se realizó un trabajo con *P. megistus* para determinar la colonización de esta especie en ecótopos artificiales; en uno de los ranchos analizados todos los insectos colectados mostraron proteínas de sangre de mofeta y dentro de este mismo grupo ocho lo fueron para proteínas sanguíneas de origen humano; el índice de infección natural por *T. cruzi* en estos insectos fue de 99,1 % (Steindel et al., 1994).

Un amplio eclecticismo alimentario fue determinado en la especie *T. brasiliensis*, en Brasil, advirtiendo que en los sitios silvestres como cuevas y rocas los triatomíneos no encuentran suficiente alimento y esto ejerce presión en los insectos para suplir sus requerimientos nutricionales en otros hábitats con menos competencia y con mayor oportunidad de alimento (Costa et al., 1998).

El mismo comportamiento eurifágico fue observado para poblaciones de *T. vitticeps* de domicilio, las cuales fueron reactivas para nueve hospederos diferentes, destacándose en mayor frecuencia armadillo (30,3 %), seguido de humano y cerdo (13,1 %) (Goncalves et al., 2000), contrario a lo encontrado en el estado de Rio de Janeiro, Brasil, en donde la mayor fuente alimentaria para esta especie fue humana (31,4%), seguido de roedor y ave (Lorosa et al., 2003).

Especies silvestres como *T. rubrovaria* y *T. sordida*, en países del cono sur, tienen importancia epidemiológica como vectores de *T. cruzi*, por su amplia distribución y su tendencia a invadir ambientes domésticos, que podrían eventualmente reemplazar al vector domiciliado *T. infestans* en las zonas controladas.

Varios son los trabajos encaminados a determinar su papel en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, determinando sus hospederos; 250 ejemplares de *Triatoma rubrovaria*, especie con amplia distribución en Uruguay, colectados en ecótopos naturales y artificiales, mostraron como hospederos principalmente a bóvidos seguido de aves y marsupiales. Se hallaron 19 ejemplares de procedencia

peridomiliaria y silvestre alimentados con sangre humana. Se determinó el carácter eurifágico de esta especie en los diferentes hábitats, aunque infección natural con *T. cruzi* solo se encontró en un individuo, su amplia dispersión podría aumentar el riesgo de infección a humanos (Salvatella et al., 1994).

Otros autores estudiando la misma especie en hábitats domiciliarios y extradomiciliarios en el estado de Rio Grande, Brasil, encontraron amplio eclecticismo en la alimentación corroborando lo anterior. Aunque, la sangre humana se detectó en 1,3% de los ejemplares, altas tasas para opossum y rata fueron establecidas, sugiriendo que la especie no está muy asociada al hombre, sino a hospederos sinantrópicos y domésticos (Almeida et al., 2002).

En un estudio llevado a cabo en el noreste Argentina, humanos, perros, pollos y gatos fueron los principales hospederos de *T. infestans* domiciliado, indicando que los animales domésticos cumplen un papel crucial en la transmisión domiciliaria del parásito (Gurtler et al., 1998).

R. pallescens en Panamá es uno de los principales vectores tanto de *T. cruzi* como *T. rangeli*. En un estudio epidemiológico realizado en hábitats domésticos, peridomésticos y en palmas a menos de 100 metros de las casas (silvestres) en dos localidades, indicaron el carácter zoofílico de esta especie, que se alimenta principalmente de animales silvestres, siendo la sangre de los opossums la fuente alimentaria preferida.

De los 829 ejemplares de *R. pallescens*, 466 contenían suficiente sangre para la identificación de hospederos. Marsupiales (opossums) se identificaron en 82,6 %, sangre de murciélago fue reactiva en 2,8 %, oso perezoso, 0,8 % y humano 0,4 %. Únicamente 2,3 % se alimentaron con aves o reptiles.

La abundancia de animales silvestres en el área ha contribuido al mantenimiento de *R. pallescens* en su propio ecótopo natural, ya que las fuentes sanguíneas de estos mamíferos son suficientemente abundantes para cumplir sus requerimientos. Sin embargo, cambios ecológicos tales como la deforestación pueden causar mortalidad de los hospederos silvestres, conduciendo a un pobre

estado nutricional para los triatominos, que induce al insecto a buscar nuevas fuentes alimentarias en otros hábitats (Vasquez et al., 2004).

Hospederos de *R. prolixus* y *Panstrongylus geniculatus* colectados en domicilios del estado de Lara en Venezuela fueron evaluados por medio de la técnica de Dot-ELISA, mostrando que 58,3 % de los contenidos intestinales de *R. prolixus* reaccionaron con el antisuero humano y 11,1 % con el de ave. Dos insectos mostraron combinación de sangre humana con perro y humana con ratón. A 15 insectos positivos para *T. cruzi*, se les detectaron proteínas de origen humano. Solamente un insecto de *P. geniculatus* e infectado con *T. cruzi* fue positivo con el antisuero humano (Feliciangeli et al., 2004).

Un reciente estudio realizado en Colombia con el propósito de determinar las fuentes alimentarias de *Belminus herreri*, llevado a cabo en el CINTROP, mostró que esta especie se alimenta con hemolinfa de cucarachas, pero que eventualmente podría convertirse en un vector potencial para la enfermedad de Chagas, dado que fue encontrado naturalmente infectado con *T. cruzi* y bajo condiciones de laboratorio ingiere sangre del contenido intestinal de *R. prolixus* previamente alimentado con sangre de gallina (Sandoval et al., 2004).

Todos estos trabajos han permitido conocer aspectos relacionados con el comportamiento de diferentes tipos de triatominos frente a sus hospederos y sus implicaciones en la transmisión de *T. cruzi* en varias regiones de Centro y Suramérica, sin embargo pocos trabajos de *T. dimidiata* han sido publicados.

En Costa Rica, insectos colectados en ambiente doméstico y peridoméstico, mostró su alimentación en 46% de humanos, 29% en roedores, 15% en aves, en opossum el 11% y 31% fueron infecciones mixtas (Zeledón et al., 1973). Este autor, mostró que las ninfas de *T. dimidiata* se mueven mucho más que los adultos, porque 28,9% de las ninfas que se encontraron fuera de las casas contenían sangre humana, comparada con 15,5% de los adultos.

Eclecticismo no es solo visto en el rango de hospederos sino también en la selección de sitios de descanso o refugios; el hallazgo de sangre de vertebrados poikilotérmicos en *T. dimidiata* es evidencia de un bajo grado de especificidad de hospederos en esta especie. Este mismo autor en 1975 observó que en ambiente

selvático se alimenta de *Didelphis marsupialis*, aves y reptiles (Zeledón et al., 1975).

Estudios posteriores realizados en el mismo país, en triatominos de peridomicilio mostraron proteínas de origen humano en 67% de los insectos analizados, seguido de perro con 49,8 %; roedores y aves mostraron valores de 14,2 y 13,8 % respectivamente; *Didelphis marsupialis* fue identificado en menor porcentaje (8,2) (Calderón-Arguedas et al., 2001).

En la provincia de Heredia, fueron analizados 100 insectos de los cuales 51 fueron positivos para roedor, seguido de perro, ave y humano con 43, 35 y 32 % respectivamente, 15 % lo fueron para opossums. El hallazgo de colonias peridomiciliarias de *T. dimidiata* confirma la tendencia de este insecto a invadir ecótopos artificiales; los animales domésticos podrían actuar como una barrera en el peridomicilio ya que son las primeras fuentes alimentarias para el insecto. En este trabajo, perros, roedores y opossums fueron probablemente la principal fuente de infección para los insectos (Zeledón et al., 2005).

En Panamá, se identificaron como hospederos de *T. dimidiata* a humanos en 38 % de los 363 insectos analizados, seguido de gallinas (19 %) y perros (17 %); un porcentaje menor (11) fue para mamíferos y aves de otras familias (Christensen et al., 1988).

La alimentación se puede considerar como un factor que afecta la dinámica poblacional de los insectos de una manera directa afectando la longitud del ciclo de vida y la fecundidad o el potencial de oviposición o indirecta sobre la mortalidad ya sea por interacción con los factores físicos del ambiente o determinando diferencias en características del comportamiento tales como la dispersión (Rabinovitch, 1985).

Las características de las viviendas y las áreas circundantes de las áreas endémicas para estos triatominos, el alimento no es un problema en cuanto a su disponibilidad total. Sin embargo, la limitación alimentaria puede regular las poblaciones no tanto por la disponibilidad de hospederos, sino con la irritación o "stress" de los hospedadores, que es generado por el aumento en la población de triatominos disminuyendo el estado nutricional de los insectos por las sucesivas interrupciones debido a la molestia causada a los hospederos por la picadura de los insectos. Este fenómeno de densodependencia por huésped en los triatominos estaría dado no por una limitación en la cantidad de alimento disponible, sino en la accesibilidad al mismo (Rabinovich, 1985).

Si bien es reconocido que la proximidad de la fuente alimentaria es uno de los principales factores de atracción para la ubicación de los triatomíneos en un cierto sitio de reposo, es probable que éste no sea el único factor que produce dicho resultado, pudiendo pensarse también que intervienen la característica física del refugio, la existencia de ciertas feromonas y olores.

Los efectos conjuntos de la densidad de los triatomíneos por hospedador y del tipo de hábitat del domicilio y del peridomicilio, constituyen un componente fundamental en la colonización de nuevas viviendas y en la regulación poblacional de los triatomíneos. Estos factores unidos a la necesidad de conocimiento sobre los mecanismos de dispersión de los triatomíneos influyen en la posibilidad de controlar las poblaciones del vector en las áreas endémicas.

5. METODOLOGIA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Transversal de tipo descriptivo.

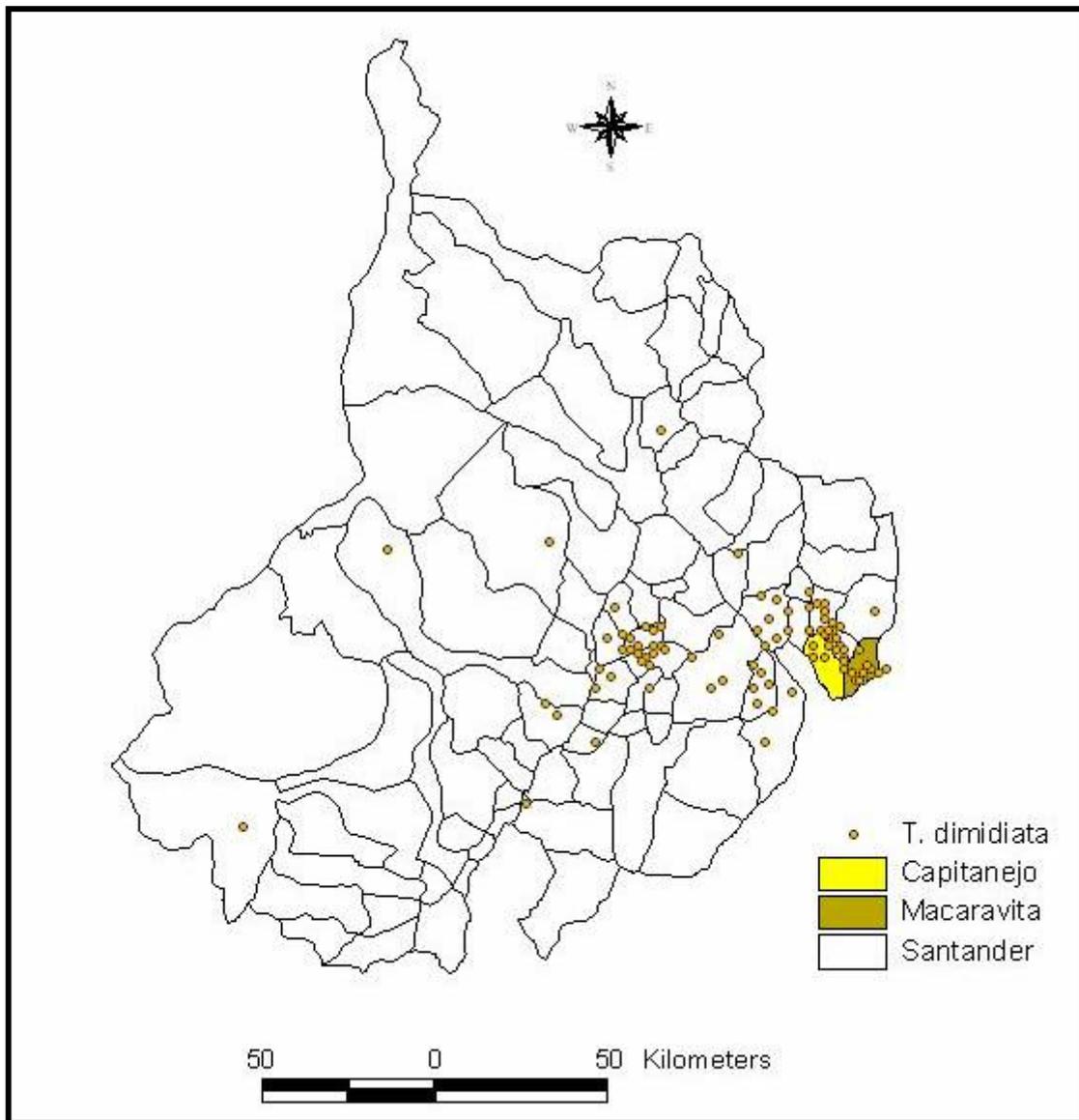
5.2 AREA DE ESTUDIO

Este estudio fue realizado en el área rural de los municipios de Macaravita (6° 30", Latitud Norte y 72° 35", Longitud Oeste) y Capitanejo (6° 3" Latitud Norte y 72° 42" de Longitud Oeste); ubicados en las estribaciones de la cordillera oriental formando uno de los costados del Valle del río Chicamocha y caracterizados por un paisaje montañoso con alturas desde 1090 m.s.n.m (Capitanejo) hasta 2500 m.s.n.m (Macaravita) con temperaturas oscilantes entre 12 y 25° C.

Esta región se caracteriza por su gran diversidad de zonas de vida y formaciones vegetales: bosque húmedo tropical (bh-T), bosque húmedo premontano (bh-PM) y bosque húmedo montano bajo (bh-MB), entre otros. El paisaje natural está compuesto por montañas rocosas, con relieve relativamente quebrado y escarpado que sirve de hábitat para animales silvestres.

La vegetación se caracteriza por escasez de árboles, pocos parches de bosque secundario y arbustos de copa aparasolada y poco follaje. Sus tierras son improductivas a causa de la tala indiscriminada, el desbordamiento de sus ríos y por la siembra de cultivos ilícitos (Figura 1).

Figura 1. Mapa con la distribución de *T. dimidiata* en el departamento de Santander.



Fuente CINTROP-UIS

5.3 POBLACION DE ESTUDIO

Correspondió a ejemplares de diferentes estadios de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) colectados en hábitats domiciliarios, peridomiciliarios y silvestres de las áreas rurales de los municipios de Capitanejo y Macaravita en Santander (Figura 2).

Figura 2. Panorámica de la zona de estudio.

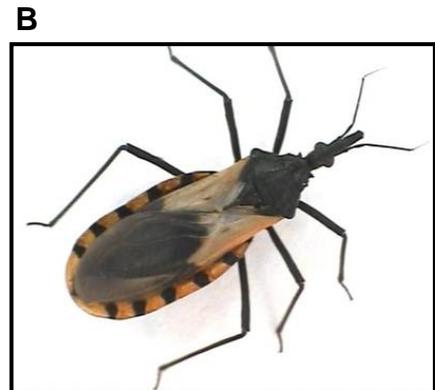


A. Vereda de Capitanejo. B. Vereda de Macaravita.
Fuente CINTROP UIS.

5.4 SELECCION DE LA MUESTRA

Los ejemplares de *T. dimidiata* (Figura 3), fueron colectados en el período comprendido entre los años 2002-2007 de tres hábitats diferentes: intradomicilio rural, peridomicilio y silvestre (Angulo et al., 2004, 2006). Las veredas seleccionadas para el estudio fueron aquellas en las que previamente se había reportado *T. dimidiata*. Solamente se incluyeron para este estudio los insectos que en el momento de la disección mostraran suficiente contenido intestinal para su proceso mediante la técnica de ELISA.

Figura 3. Ejemplares de *T. dimidiata* colectados en la zona de estudio



A. Macho, B. Hembra.
Fuente CINTROP-UIS

5.5 VARIABLES

Las variables que se utilizaron para los análisis estadísticos fueron de tipo nominal, indicada como presencia o ausencia de la fuente alimentaria (hospedero) detectada en cada insecto por la prueba de ELISA en los hábitats de estudio.

5.6 SITIOS DE COLECTA

Los triatominos de domicilio y peridomicilio fueron colectados en nueve veredas de Capitanejo y cuatro veredas del municipio de Macaravita. Los silvestres en dos veredas de Capitanejo y una de Macaravita. Los insectos de intradomicilio se colectaron en habitaciones, cocina, corredores, paredes externas (Figura 4).

Figura 4. Hábitats de la zona de estudio.



A. Intradomicilio. B. Silvestre (cuevas) C. Silvestre (rocas), D. Peridomicilio (caney).
Fuente CINTROP UIS

Los de peridomicilio en gallineros, caneyes, corrales de cabras, tabacaleras, hornos de barro, conejeras, camas de perros, sitios de descanso de ganado vacuno y los silvestres en cuevas, acúmulos de rocas y casas abandonadas (Figura 4).

5.7 METODOS DE COLECTA Y MANEJO DE MATERIAL COLECTADO

Los ejemplares de *Triatoma dimidiata* fueron colectados por investigadores, personal del laboratorio de entomología del CINTROP (Biólogos y auxiliares de campo), técnicos de ETV y la comunidad de las zonas de estudio (Angulo et al., 2004; Angulo et al., 2006), utilizando la técnica hora/hombre en domicilio y peridomicilio y con trampas de cebo animal en el hábitat silvestre (Angulo VM, datos no publicados) (Figura 5).

Para cada hábitat y sitio de colecta se registraron datos de fecha de colecta, hábitat y sitio de colecta, jefe de hogar, vitalidad, presencia de animales. Una vez ingresados los triatominos al laboratorio de entomología, éstos fueron identificados por medio de la clave de Lent & Wygodzinsky (Lent & Wygodzinsky, 1979). Se realizaron disecciones y el contenido intestinal (intestino anterior) fue almacenado en 200 µl de PBS (Phosphate Buffer Saline) 0.1M pH 7.2 a -20°C; contenidos intestinales insuficientes se almacenaron en 50 µl de PBS.

Figura 5. Trampa con cebo animal (gallina), para colecta de insectos silvestres (Angulo VM).



Fuente CINTROP UIS.

5.8 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA (Enzyme Lynked Immunosorbent Assay)

Para identificar el origen de las proteínas sanguíneas presentes en los contenidos intestinales de los triatomíneos se estandarizó la técnica de ELISA que incluyó varias fases:

5.8.1 Preparación de antisueros policlonales. Se prepararon 12 antisueros anti-especie animal (gallina, bovino, caprino, canino, equino, gato, ovino, porcino, *Rattus rattus* (rata), *Dasypus novemcinctus* (armadillo), *Didelphis marsupialis* (opossum-fara) y humano) en conejos de raza Nueva Zelanda.

Los conejos (dos para cada especie) fueron inmunizados semanalmente con los sueros (proteínas totales) utilizados como antígenos. 1ml de una mezcla de suero y adyuvante completo de Freund en una relación 1:1, fue aplicada a través de múltiples inoculaciones intradérmicas en la primera inmunización y en las cuatro subsiguientes el mismo inmunógeno con adyuvante incompleto de Freund (inmunización potenciadora) (Johnstone & Thorpe, 1987).

Los conejos se sangraron por punción cardiaca siete días después de la inmunización potenciadora y los antisueros obtenidos fueron alicuotados y almacenados a -20 °C.

Nueve antisueros fueron producidos previamente en el laboratorio de inmunología del CINTRON y tres durante este trabajo en el mismo laboratorio (*Dasypus novemcinctus* (armadillo), *Didelphis marsupialis* (opossum-fara) y gato) (Figura 6). Los antisueros fueron analizados posteriormente para la actividad de anticuerpos y especificidad por ELISA.

Los animales silvestres capturados en campo se anestesiaron para la obtención de muestras sanguíneas y posteriormente fueron liberados en su hábitat natural.

De igual manera, los conejos inmunizados fueron anestesiados antes de realizar la punción cardiaca y para su sacrificio posterior, de acuerdo con las normas éticas para el cuidado y manejo de animales descrito en los aspectos éticos.

Figura 6. Producción de antisueros policlonales anti-especie animal en conejos



A. Sangrado de armadillo (*Dasypus novemcinctus*) anestesiado. B. Inoculación de conejos. C. Sangría conejos (separación de antisueros).

Fuente CINTROP UIS

5.8.2 Titulación de antisueros policlonales. El ELISA realizado fue una versión modificada basada en el protocolo de antígenos inmobilizados (Voller et al., 1976; Burkot et al., 1981); éste fue realizado en microplacas de poliestireno de 96 pozos (NUNC[®]) (Anexo A). Sueros diluidos 1/16.000 en buffer carbonatos pH 9,6, fueron incubados durante dos horas a 37°C. Después de lavar las placas cinco veces con PBS-Tween 20 0.05 % a pH 7.2, se adicionaron e incubaron por una hora los antisueros diluidos (1/1.000-1/2.048.000) en PBS-Tween Albúmina 3% y posteriormente fueron lavados de nuevo.

Anti-IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina (SIGMA[®]) diluida 1/4.000 fue añadida, utilizando el mismo tiempo de incubación y lavados. La actividad enzimática fue detectada por la adición del sustrato cromogénico p-nitrofenilfosfato. Después de 15 minutos de incubación la reacción fue detenida con NaOH 3N y las absorbancias leídas a 405 mn en un lector de ELISA (Anthos 2020). En este trabajo se optimizó la técnica de ELISA, basados en un trabajo anterior (Farfán et al., 2005).

Cada título fue determinado a partir de los radios de unión BR (Binding Ratio) mayores a 1.0 que se calcularon dividiendo la densidad óptica del antígeno homólogo en la promedio de blancos y éstos fueron expresados como el inverso de la dilución. Curvas de titulación fueron realizadas adicionalmente para visualizar el comportamiento general de los títulos en los antisueros (Crowther, 2001), además se estableció un punto de corte tomando el promedio de las lecturas de los blancos más dos desviaciones estándar.

Para asegurar monoespecificidad de los antisueros, reactividad cruzada fue determinada utilizando la misma metodología con los antígenos heterólogos diluidos 1/10 y 1/200.

5.8.3 Purificación de anticuerpos no específicos. Absorción de anticuerpos no específicos de cada antisuero fue realizada. Para ésto, pools de los sueros heterólogos fueron mezclados con diferentes diluciones de los antisueros a absorber en PBS pH 7.2, según modificaciones hechas en este estudio a la metodología de Weitz (Weitz., 1956).

Los antisueros se absorbieron mezclando 100 partes de éstos, diluidos 1/50, 1/100 y 1/200 en PBS, con una parte del pool de sueros heterólogos (Anexo B). Este proceso se repitió hasta que los valores de densidad óptica de los antisueros heterólogos no superaran los valores del punto de corte, tomando la media más dos desviaciones estándar.

Después de retirar anticuerpos inespecíficos estos antisueros absorbidos fueron de nuevo titulados y determinados sus títulos finales. Para la reactividad cruzada, cada antisuero se retó en una dilución 1/100 contra todos los sueros, diluidos en 1/10, 1/200 y 1/400.

5.8.4 Determinación de proteínas de antisueros absorbidos y controles. Se determinó la concentración de proteínas de los antisueros absorbidos sin diluir y diluidos 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/150 y 1/200; las diluciones de los controles positivos correspondieron a 1/10, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/250 y 1/300. Para ésto, fueron preparadas curvas de calibración de proteínas en mg/ml y μ gr/ml utilizando BSA (Bovine Serum Albumine) de 2 mg/ml como estándar de proteínas según el método de Bradford (Bio-Rad®) (Anexo C). Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

5.8.5 Establecimiento de diluciones mínimas de los reactantes para el ELISA. Para determinar la reactividad de los antisueros absorbidos en la detección de proteínas sanguíneas mediante la prueba de ELISA, se prepararon contenidos intestinales de triatominos alimentados sobre diez de los doce hospederos descritos arriba y con triatominos sin alimentar. Para ello, ninfas de V estadio de *R. prolixus* (cepa UIS) dispuestas en cajas de Petri en grupos de cinco, fueron alimentadas sobre cada animal durante 30 minutos, luego de 10 días se disectaron y su contenido intestinal fue almacenado en 200 μ l de PBS a -20 °C (Figura 7); los controles negativos correspondieron a contenidos intestinales de insectos con ayuno de dos meses.

Controles positivos diluidos 1/50, 1/100 y 1/200 se retaron en un ELISA con los antisueros 1/50, 1/100 y 1/200 y se estableció un punto de corte tomando la media más dos desviaciones estándar, con los controles negativos se realizó el mismo procedimiento.

Figura 7. Alimentación de ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* sobre opossum (*Didelphis marsupialis*) anestesiado



Fuente. CINTROP UIS.

Los mismos controles diluidos (1/50, 1/100, 1/200, 1/400) se sometieron a reaccionar con los antisueros homólogos desde 1/100 hasta 1/102.400 para determinar sus títulos frente a estos controles; concentraciones de conjugado, tiempos de incubación, de lavados y tiempo de revelado fueron determinados (Anexo D).

5.9 ELISA PARA LA IDENTIFICACION DE HOSPEDEROS DE *T. dimidiata*

Los contenidos intestinales de los insectos almacenados se procesaron por medio de la técnica de ELISA estandarizada como se describió antes. Cada contenido intestinal se procesó frente a los doce antisueros absorbidos en placas de poliestireno de 96 pozos y con sus respectivos blancos, controles positivos y negativos (Anexo D). Se determinó como positivo aquel contenido intestinal cuya densidad óptica fuese mayor al punto de corte preestablecido.

Los hospederos de *T. dimidiata* fueron determinados por la reactividad ante cada antisuero específico y se establecieron las proporciones de hospederos identificados para cada ejemplar.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se registraron en una base datos en Excel (Microsoft Office, 2003). Los análisis se realizaron con el software Stata (Stata corp. 2005) y Statistica (Stat Soft, 2004). Los resultados obtenidos en la identificación de las fuentes alimentarias de *T. dimidiata* se expresaron por medio de porcentajes. Los porcentajes de reactividad para cada uno de los antisueros fueron evaluados mediante pruebas de comparación de proporciones muestrales.

Para estudiar la existencia de asociación entre las proporciones de los hospederos identificados en los hábitats (variables nominales) se utilizó la prueba de Chi – cuadrada (χ^2) aplicando la corrección de continuidad de Yates, cuando la tabla de contingencia era de 2 x 2 y la prueba de Fisher si alguna de las frecuencias esperadas era menor de 5. Se establecieron diferencias de un hospedero con respecto a otro en cada hábitat. Adicionalmente, con el software Stata se determinaron los intervalos de confianza del 95 % (binomial exacta) para las frecuencias observadas.

Aspectos éticos

El protocolo utilizado en el manejo de animales, fue revisado y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Se siguieron las normas éticas para todos los procedimientos que se realizaron con los animales de acuerdo a lo expresado en la Ley 84 de 1989 y a la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Protección Social de Colombia. Además se aplicaron las recomendaciones y protocolos para el cuidado, manejo, mantenimiento y sacrificio de animales del IACUC (Institutional Animal Care and Use Committe) de la Universidad de Minnesota, AVMA (American Veterinary Medical Association), EFPIA (The European Federation of Pharmaceutical Industries) y Associations/ECVAM (The European Center for the Validation of Alternative Methods).

6. RESULTADOS

6.1 DISTRIBUCION DE EJEMPLARES DE *Triatoma dimidiata* COLECTADOS EN LA ZONA DE ESTUDIO

Las muestras utilizadas para este estudio se colectaron en 13 veredas en los dos municipios, de los cuales el mayor número de triatomos fue colectado en el hábitat peridomiciliario (38%) (Tabla 1). Se incluyeron para este estudio 367 ejemplares de *T. dimidiata* procedentes de domicilio, peridomicilio, silvestre.

En el domicilio los insectos fueron colectados principalmente en las camas y paredes de las habitaciones (62,5 %), en los corredores y paredes externas e internas de las viviendas (33,3 %), con menor frecuencia se encontraron en la cocina (4,2 %).

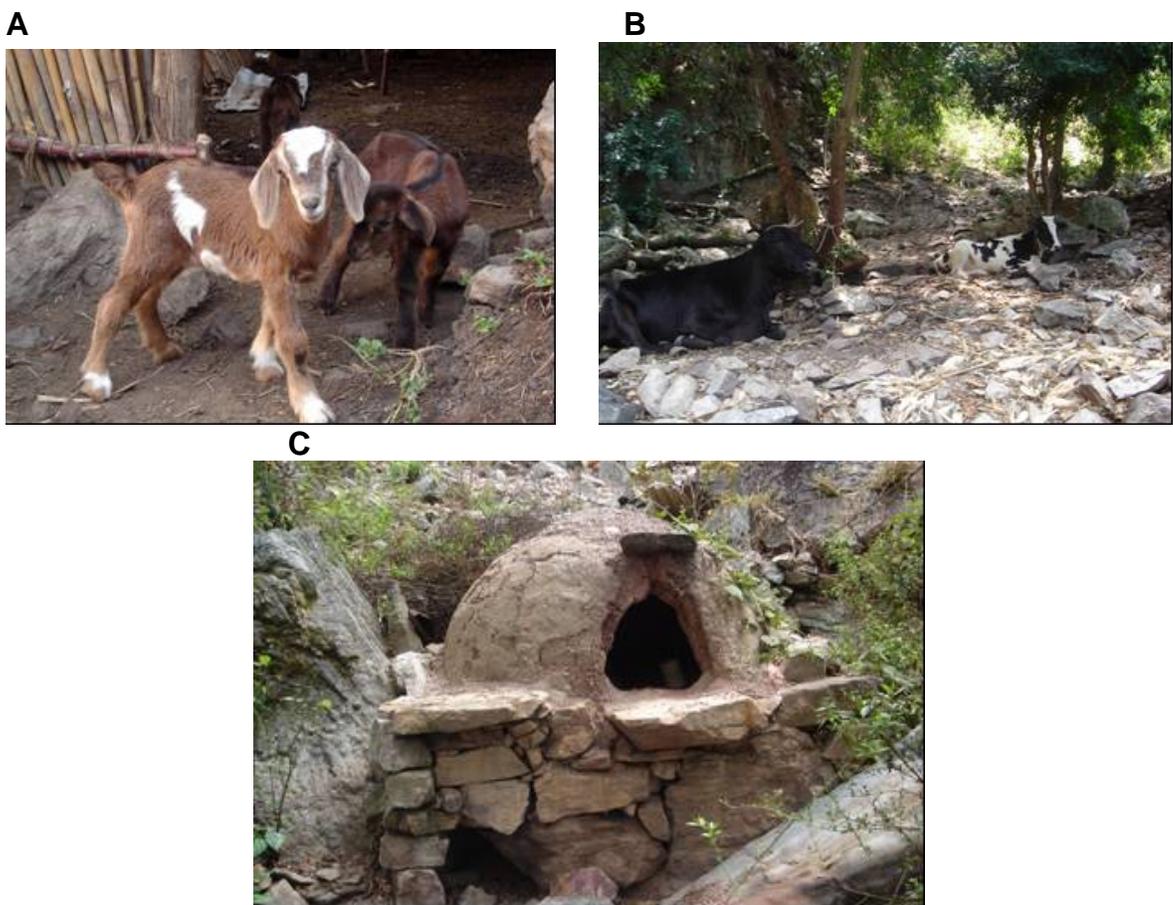
Tabla 1. Distribución de *Triatoma dimidiata* por veredas

Municipio	Veredas	ID	P	S	Total
Capitanejo	Chorreras	11	7	37	55
	Montecillo	-	-	50	50
	Molinos	2	4	-	6
	Ovejeras	2	2	-	4
	Sebaruta	2	2	-	4
	Hoya Grande	2	1	-	3
	Platanal	-	3	-	3
	Carrizal	-	2	-	2
	La Mesa	1	-	-	1
	Subtotal		20	21	87
Macaravita	Buraga	97	119	4	220
	Huertas	11	-	-	11
	Juncal	3	1	-	4
	Llano Grande	4	-	-	4
	Subtotal		115	120	4
TOTAL		135	141	91	367

ID: intradomicilio; P: peridomicilio; S: silvestre

La información de estructuras peridomiciliarias se obtuvo para 122 insectos. Los lugares de mayor colecta fueron el caney (enramada construida para secar tabaco que es utilizada como sitio de reposo de bóvidos y caprinos) y los hornos de barro con 45,9 % y 27 %. Otros sitios como gallineros, cama de perros, acúmulos de piedras o leña alrededor de la casa correspondieron a proporciones menores al 5 %. Aunque el número de gallineros en donde se colectaron los insectos correspondió a un número pequeño, previas encuestas entomológicas en la zona, determinaron gran proporción de éstos, junto a corrales de cabras (Figura 8).

Figura 8. Hábitats peridomiciliarios

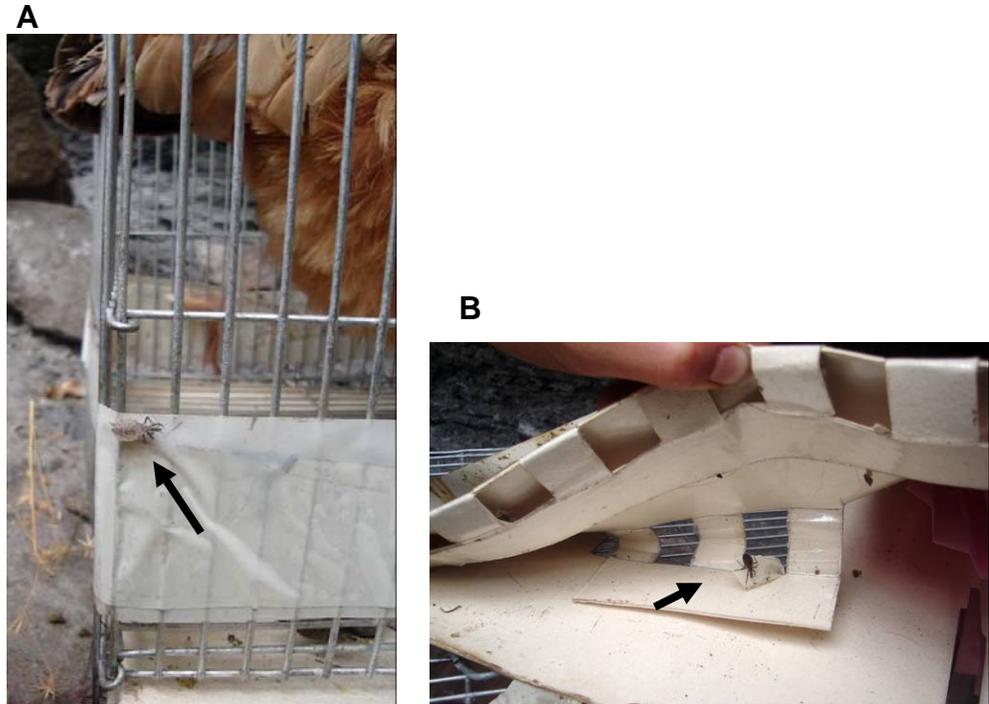


A. Cabras en lugares de reposo; B. Bovinos en sitios cercanos a las viviendas; C. Horno de barro a 5 metros de una vivienda.
Fuente CINTROP UIS

Se obtuvo información de todos los lugares de colecta en los hábitats silvestres; piedras y acúmulos de piedras fueron los sitios comunes (61,5 %), cuevas en la base de montañas rocosas o debajo de rocas muy grandes ubicadas desde

menos de 30 metros hasta 400 metros de distancia fueron determinadas en 33 %. También se hallaron en otros sitios como paredes de casas abandonadas (3,3 %) y otros lugares como muros de piedra de separación de predios o potreros lo fueron en 2,2%. En la figura 9 se observan algunas trampas positivas con ninfas de *T. dimidiata* en cuevas.

Figura 9. Trampas con cebo animal (gallina) positivas



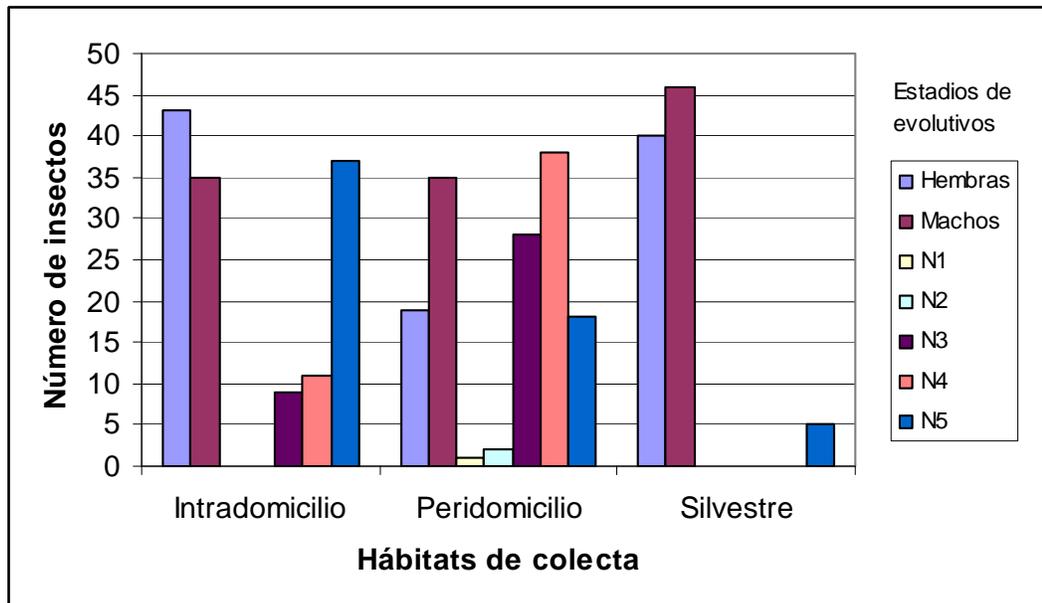
A. Trampa positiva, ninfa pegada a la cinta. B. Sensor positivo, ninfa pegada a la cinta. Fuente CINTROP UIS. (Angulo VM, datos no publicados).

En encuestas realizadas durante periodos de vigilancia entomológica en la zona, se determinó un promedio de cuatro personas por vivienda. Animales domésticos como gallinas, cabras, bovinos y equinos fueron los de mayor densidad en el peridomicilio, perros, gallinas y gatos estuvieron más asociados a la vivienda humana. Los pobladores se refirieron a la presencia de armadillos, zorros y opossums silvestres. No se determinó la presencia de ovinos ni de porcinos en el área de estudio (Angulo et al., 2004).

Se colectaron todos los estadios evolutivos, hembras, machos y ninfas con 28,3 %, 31,5 % y 40,2 % respectivamente. Dentro del grupo de ninfas, las de IV y V estadio de desarrollo correspondieron al mayor número (Figura 10).

Ninfas de IV y V estadio y adultos fueron hallados en mayor número en domicilio y peridomicilio de Macaravita, en el hábitat silvestre de Capitanejo fue colectado mayor proporción de adultos. Los estadios ninfales de temprano desarrollo se encontraron en menor número en todos los hábitats estudiados (Figura 10).

Figura 10. Distribución de estadios evolutivos de *T. dimidiata* colectados en la zona de estudio.

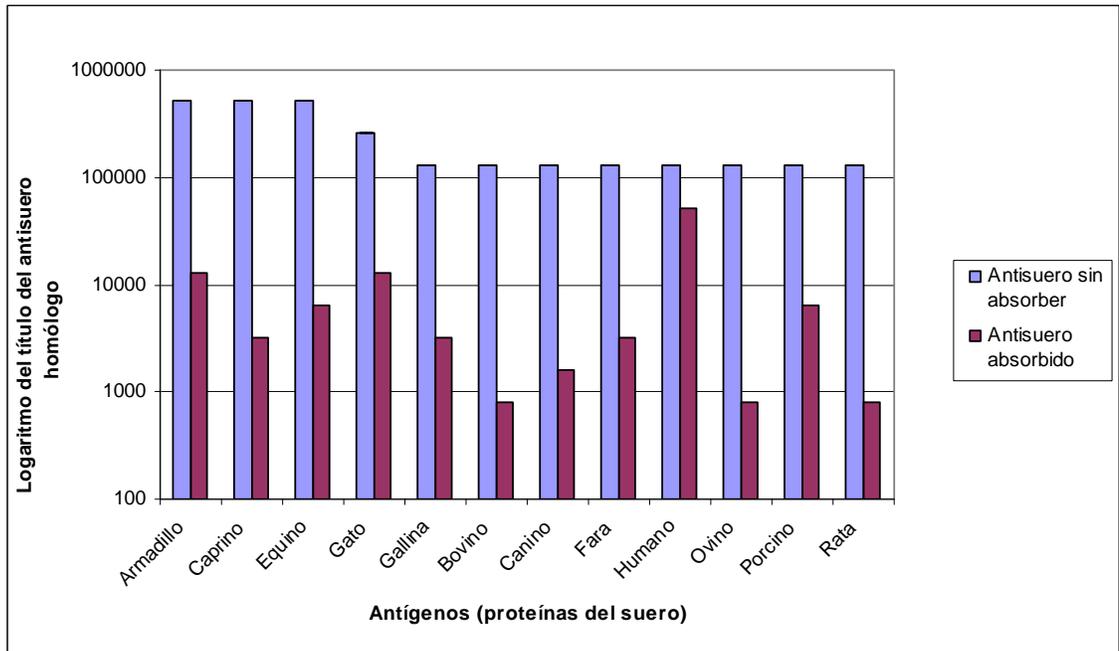


6.2 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

6.2.1 Títulos de antisueros policlonales sin absorber y absorbidos. Las máximas diluciones reactivas de los doce antisueros por la técnica de ELISA se establecieron en un rango que varió desde 1/128.000 hasta 1/512.000 (Figura 11). Los mismos rangos se observaron en los títulos de conejos inmunizados pareados y en los duplicados de las titulaciones.

Los antisueros de armadillo, caprino, equino y gato presentaron los títulos más altos, los demás antisueros mostraron títulos de 1/128.000 (Figura 11).

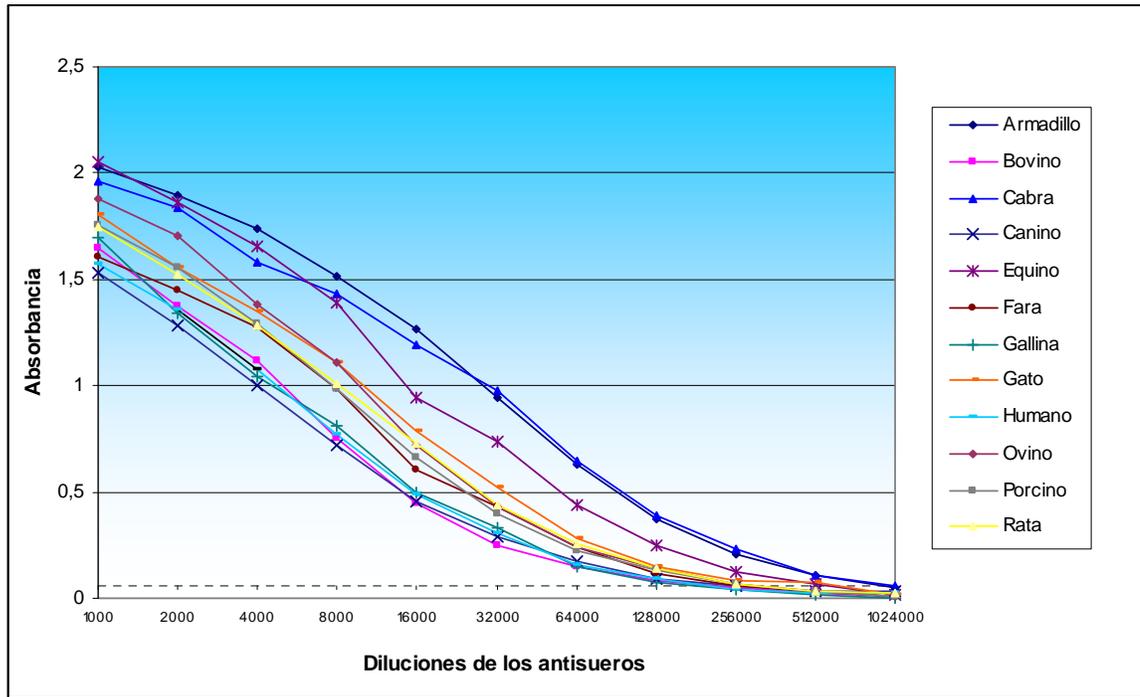
Figura 11. Distribución de los títulos de los antisueros sin absorber y absorbidos.



Para las diluciones utilizadas las curvas de titulación de los antisueros mostraron homogeneidad en las densidades ópticas obtenidas. Estos valores variaron en la menor dilución (1/1.000) desde 1,53 en el de canino hasta 2,1 para el de armadillo, para posteriormente disminuir reactividad con valores cercanos al punto de corte (0,06) (Figura 12).

Los índices de radio de unión calculados relacionando las titulaciones reactivas con el promedio de blancos, mostraron con mayor claridad el título final de cada antisuero.

Figura 12. Curvas de titulación de los antisueros no absorbidos

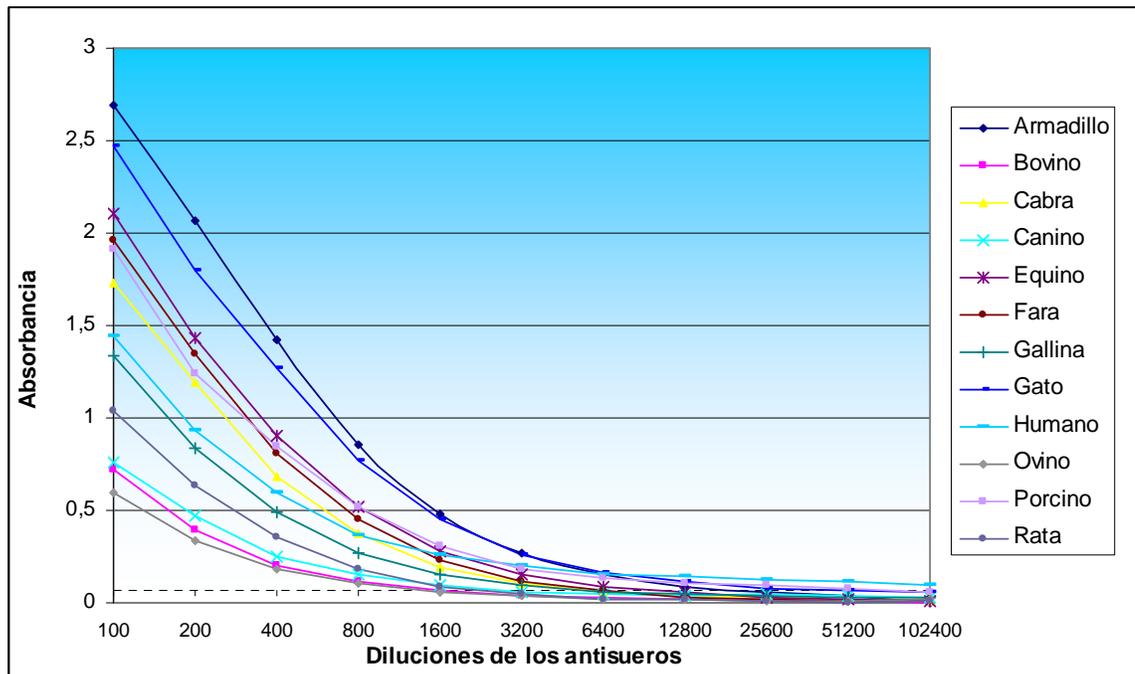


En la reacción cruzada de los antisueros con los sueros heterólogos, se observó reactividad en todos, excepto para el de gallina. Estas reacciones inespecíficas detectadas mediante el ELISA, fueron eliminadas con los procesos de absorción aplicados, que se repitieron hasta eliminar eficazmente estos anticuerpos (Anexo B).

Los títulos de los antisueros disminuyeron con un rango que varió desde 1/800 hasta 1/51.200, siendo el más alto para humano y los más bajos para bovino, ovino y rata. En general, los títulos finales en promedio correspondieron a valores entre 1/3.200 y 1/6.400 (Figura 11 y 13).

Luego del procedimiento de absorción realizado a cada uno de los antisueros, se observó gran diferencia en las absorbancias de cada uno de ellos, con una franca disminución en los títulos para la mayoría de los antisueros. Las densidades ópticas en la dilución menor (1/100) variaron desde 0,6 para el antisuero de ovino hasta 2,69 para el de armadillo (Figura 13).

Figura 13. Curvas de titulación de los antisueros absorbidos



Al igual que para los antisueros no absorbidos, los índices de radio de unión calculados relacionando las titulaciones reactivas con el promedio de blancos, mostraron con mayor claridad el título final de cada antisuero.

6.2.2 Concentración de proteínas de antisueros policlonales absorbidos. Estas se determinaron para establecer la concentración final de los antisueros luego de los procesos de absorción realizados.

En las curvas de calibración de proteínas preparadas de 0,025-1 mg/ml ($R^2 = 0,993$), 1-30 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,998$) y de 40-100 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,996$) (Anexo C), se determinó la concentración de proteínas en los antisueros absorbidos sin diluir en un rango que varió desde 0,70 para el antisuero de gallina hasta de 0,85 mg/ml para el antisuero de armadillo (Tabla 2).

En las diluciones realizadas se determinó una concentración máxima de 0,05 mg/ml para la dilución de 1/10 hasta de 5,5 $\mu\text{g/ml}$ para la de 1/200 (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de proteínas de los antisueros absorbidos

Antisuero	Sin diluir mg/ml	1/10 mg/ml	1/50 µg/ml	1/100 µg/ml	1/150 µg/ml	1/200 µg/ml
Armadillo	0,85	0,035	16,6	8,2	5,6	4,6
Bovino	0,79	0,035	15,9	8,0	5,3	4,3
Cabra	0,76	0,05	16,8	8,1	5,6	5,5
Canino	0,79	0,05	17,2	7,8	6,0	4,9
Equino	0,76	0,03	15,8	7,9	5,0	4,9
Opossum	0,81	0,05	16,4	8,2	4,8	4,5
Gallina	0,70	0,05	18,1	8,1	5,4	4,6
Gato	0,82	0,04	18,2	8,0	6,0	4,0
Humano	0,82	0,05	17,6	8,0	5,5	4,7
Ovino	0,83	0,05	19,1	9,7	6,0	4,5
Porcino	0,78	0,04	19,7	8,2	5,9	4,8
Rata	0,81	0,04	19,0	7,3	6,0	4,6

Estos datos muestran valores homogéneos en la concentración de proteínas para cada antisuero en cada dilución. Se determinaron valores cercanos a 1 en mg/ml para los antisueros sin diluir. En los antisueros diluidos se detectaron proteínas hasta la dilución de 1/200 en µg/ml.

6.2.3 Concentración de proteínas de controles positivos. En las curvas de calibración de proteínas preparadas en 0,025-1 mg/ml ($R^2 = 0,993$), se determinó la concentración de proteínas en los controles positivos en un rango que varió desde 0,02 mg/ml para la dilución de 1/300 hasta de 1 mg/ml o más en las diluciones menores (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de proteínas en mg/ml de los controles positivos diluidos

Control positivo	1/10	1/50	1/100	1/150	1/200	1/250	1/300
Armadillo	>1	>1	>1	>1	0,84	0,36	0,25
Bovino	>1	0,77	0,41	0,25	0,18	0,06	0,06
Cabra	>1	>1	0,14	0,05	0,03	0,05	0,02
Canino	>1	>1	>1	0,83	0,67	0,44	0,46
Equino	>1	>1	0,91	0,69	0,56	0,42	0,38
Fara	0,98	0,33	0,16	0,06	0,06	0,03	0,04
Gallina	>1	>1	1,0	0,76	0,50	0,46	0,37
Gato	>1	>1	0,59	0,4	0,31	0,22	0,16
Ovino	>1	>1	0,93	0,93	0,87	0,67	0,56
Rata	>1	>1	0,57	0,34	0,24	0,07	<0,02

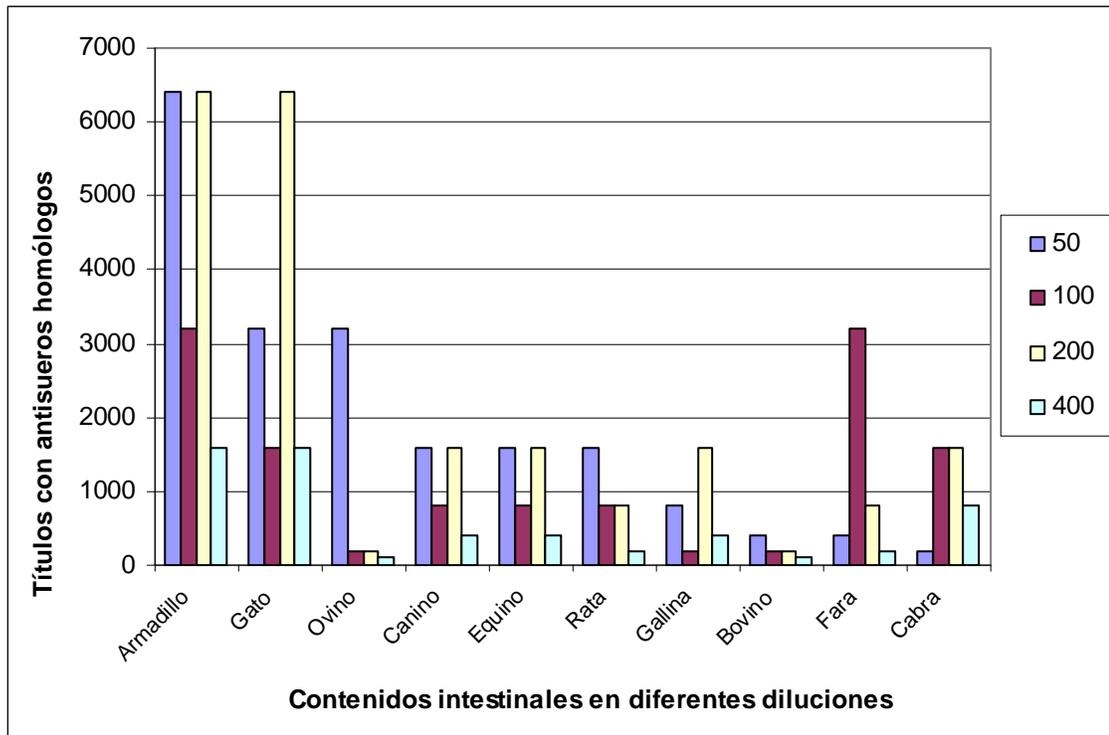
6.2.4 Títulos de controles positivos con los antisueros absorbidos. Se observó reactividad de los antisueros con todas las diluciones de los controles positivos; una notable disminución en los títulos de los controles bovino, ovino y rata, especialmente con las diluciones más altas fue observada (Figura 14).

Las variaciones en los títulos para cada dilución probablemente estuvieron influenciadas por las diferencias en la digestión de proteínas por parte de los insectos durante el tiempo transcurrido entre la alimentación y su disección y por la cantidad de sangre ingerida durante su alimentación en cada hospedero.

Las diferentes concentraciones (diluciones) de los contenidos intestinales de los controles positivos no modificaron su reactividad ante los diferentes títulos de antisueros (Figura 14).

A pesar de la disminución de los títulos de los antisueros absorbidos determinada en el ELISA con los sueros homólogos (Figura 14), estos antisueros alcanzaron valores de absorbancia por encima del punto de corte cuando se utilizaron los controles positivos.

Figura 14. Títulos de los antisueros absorbidos frente a los controles positivos

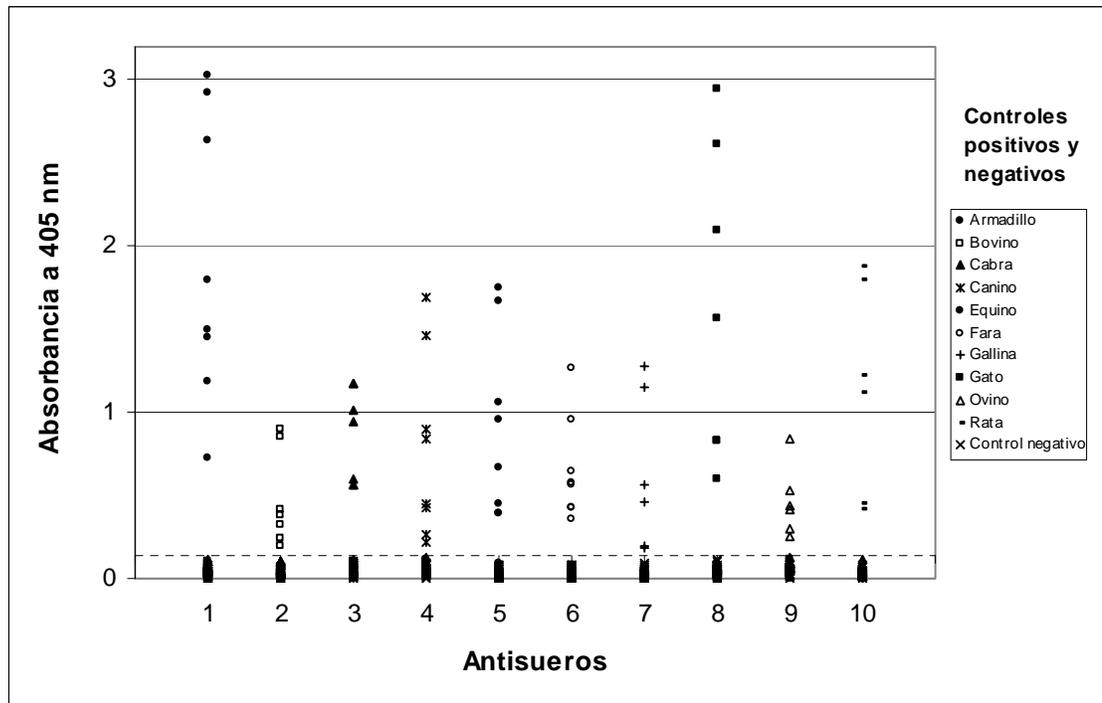


6.2.5 Optimización del ELISA para la identificación de hospederos. En la estandarización del ELISA utilizando los controles positivos, se observó reactividad específica de los antisueros, con valores de absorbancia desde 0,102 para ovino hasta 3,027 para armadillo; superiores al punto de corte preestablecido (Figura 15).

Se observaron diferencias entre la reactividad para un mismo control, dado que cada uno de éstos correspondió a contenidos intestinales de insectos diferentes, que podrían ser debidas a diferencias en la digestión de proteínas, durante el tiempo que transcurrió desde la alimentación en cada hospedero hasta la disección en el laboratorio y a la cantidad de sangre ingerida durante su alimentación.

Se determinó buena especificidad de cada antisuero por su control homólogo y todas las reacciones inespecíficas con los antisueros heterólogos estuvieron por debajo del punto de corte preestablecido (Figura 15).

Figura 15. Reactividad obtenida por ELISA con contenidos intestinales de *R. prolixus* (diez controles positivos) ante los antisueros homólogos y heterólogos.



Controles positivos y negativos: leyenda derecha. Antisueros absorbidos: armadillo, bovino, cabra, canino, equino, fara, gallina, gato, ovino y rata (1-10). La línea punteada corresponde al punto de corte.

El rango mínimo de proteínas reactantes de los antisueros a una dilución de 1/50 en el ELISA fue de 15,8 µg/ml a 19,7 µg/ml. La concentración de proteínas de los controles positivos varió entre 0,33 mg/ml hasta 1 mg/ml o más para el protocolo de ELISA final utilizado para la detección de proteínas sanguíneas en los contenidos intestinales de los insectos (ANEXO D).

6.3 HOSPEDEROS DE *Triatoma dimidiata* IDENTIFICADOS MEDIANTE LA TECNICA DE ELISA EN LA ZONA DE ESTUDIO

De los contenidos intestinales de *T. dimidiata* procesados, 42,2 % (155/367) mostraron reactividad en el ELISA para proteínas sanguíneas de uno o más de los siguientes hospederos: humano, seis domésticos (bovino, caprino, canino, equino, gallina, gato) y tres silvestres (*Didelphis marsupialis* (opossum), *Dasyopus spp* (armadillo) y *Rattus rattus* (rata)); proteínas sanguíneas de ovino y de porcino no fueron evidenciadas en las muestras analizadas.

Se observó preferencia de *T. dimidiata* de los diferentes hábitats por animales domésticos, siendo significativa la diferencia para éstos, tanto en alimentaciones únicas como combinadas con silvestres ($\chi^2 = 148,2$ $P = 0,00$); la proporción global de hospederos domésticos y silvestres detectados correspondieron a 40,6 % y 4,6 % respectivamente (Tabla 4). La sangre humana como única fuente alimentaria se observó en 3,3 % de las poblaciones de *T. dimidiata*, sin diferencias con las realizadas en animales silvestres ($\chi^2 = 1,42$ $P = 0,23$) y mostrando valores bajos comparados con las alimentaciones del vector en animales domésticos (40,6 %) ($\chi^2 = 130,9$ $P = 0,00$) (Tabla 4).

Tabla 4. Hospederos domésticos y silvestres identificados en poblaciones de *T. dimidiata* en la zona de estudio

Hábitat	Insectos Analizados	Silv n/%	Dom n/%	Solo silv n/%	Solo dom n/%	Silv+ Dom n/%	Solo hum n/%	Hum+ Dom n/%
ID	135	4/3,0	51/37,8	0/0	47/34,8	4/34,8	11/8,1	5/3,7
P	141	4/2,8	88/62,4	0/0	84/59,6	4/2,8	1/0,7	0/0
S	91	9/9,9	10/10,9	6/6,6	7/7,7	3/3,3	0/0	0/0
Total	367	17/4,6	149/40,6	6/1,6	138/37,6	11/3,0	12/3,3	5/1,4

Silv: silvestres; Dom: domésticos; Hum: humano; ID: intradomicilio; P: peridomicilio; S: silvestre

En todos los ejemplares de *T. dimidiata* analizados de los tres hábitats se observó con mayor frecuencia la alimentación con sangre de gallina (17,2 %), cabra (14,7 %) y canino (7,9 %). El hospedero humano cuarto en frecuencia y con un porcentaje de 4,6 fue seguido de armadillo, gato, bovino, equino, fara y rata con valores menores a 4 % (Tabla 5).

De manera general, en intradomicilio, gallina y humano presentaron los más altos valores (16,3 y 11,9 %) con un intervalo de confianza entre 6,9 y 23,6; en peridomicilio cabra, canino y gallina ocuparon los primeros lugares en frecuencia y en el hábitat silvestre armadillo y cabra fueron los principales hospederos (Tabla 5).

Tabla 5. Hospederos identificados en 367 ejemplares de *T. dimidiata* de la zona de estudio^a

Intradomicilio (n=135)			Peridomicilio (n=141)			Silvestre (n=91)		
Hospedero	Positividad n/%	IC95% ^b	Hospedero	Positividad n/%	IC95% ^b	Hospedero	Positividad n/%	IC95% ^b
Gallina	22/16,3	10,5-23,6	Cabra	40/28,3	21,1-36,6	Armadillo	7/7,7	3,14-15,2
Humano	16/11,9	6,9-18,5	Gallina	37/26,2	19,2-34,3	Cabra	6/6,6	2,5-13,8
Canino	9/6,7	3,0-12,3	Canino	19/13,5	8,3-20,2	Gallina	4/4,4	1,21-10,87
Cabra	8/5,9	2,6-11,3	Gato	6/4,3	1,6-9,03	Equino	3/3,3	0,69-9,3
Bovino	6/4,4	1,6-9,42	Armadillo	4/2,8	0,78-7,1	Fara	3/3,3	0,69-9,3
Gato	5/3,7	1,21-8,4	Bovino	3/2,1	0,44-6,1	Bovino	2/2,2	0,26-7,7
Equino	5/3,7	1,21-8,4	Equino	2/1,4	0,17-5,02	Canino	1/1,1	0,027-5,97
Armadillo	2/1,5	0,17-5,2	Humano	1/0,7	0,02-3,9	Gato	1/1,1	0,027-5,97
Fara	2/1,5	0,17-5,2	Fara	1/0,7	0,02-3,9	Rata	0/0	0-3,97
Rata	1/0,7	0,02-4,05	Rata	1/0,7	0,02-3,9	Humano	0/0	0-3,97
Ovino	0/0	0-2,69	Ovino	0/0	0-2,58	Ovino	0/0	0-3,97
Porcino	0/0	0-2,69	Porcino	0/0	0-2,58	Porcino	0/0	0-3,97

^a Las categorías no son exhaustivamente, ni mutuamente excluyentes debido a las alimentaciones múltiples en algunos insectos, por lo tanto el porcentaje de positividad total es mayor de 100.

^b Intervalo de confianza del 95% (binomial exacta)

Hospederos de hábitats domiciliarios: en la totalidad (100 %) de los 51 insectos reactivos, colectados en el intradomicilio, se determinó ingesta de sangre de animales domésticos, con preferencia la sangre de gallina (43,1 %). Humano fue el segundo hospedero en frecuencia (31,4 %). Canino y cabra fueron los siguientes en frecuencia (17,6 % y 15,7 %), los demás hospederos se identificaron en menor porcentaje (Tabla 6 y 7).

En este hábitat se encontraron proteínas sanguíneas de animales silvestres como armadillo, opossum y rata en 7,8 % de los insectos, aunque en menor proporción que los domésticos (Tabla 6 y 7). El hospedero humano como único sustrato de proteínas fue determinado en 21,6 % de los insectos

Hospederos de hábitats peridomiciliarios: al igual que para los insectos colectados en el intradomicilio la totalidad (100 %) de los insectos reactivos se alimentaron con animales domésticos y en menor y significativa proporción para silvestres (4,5 %). En contraste con los resultados de intradomicilio, *T. dimidiata* mostró preferencias por cabra (45,5 %), ave (42 %) y canino (21,6 %) ($p < 0,05$), sin diferencias significativas entre éstos. Como resultado relevante, humano solamente fue identificado en un caso (Tablas 6 y 7).

Hospederos de hábitats silvestres: el hallazgo más importante para los insectos colectados en este hábitat fue la presencia en mayor frecuencia de sangre de animales domésticos (62,5%). Se detectaron proteínas sanguíneas de animales silvestres en 56,3 % de los insectos, especialmente de armadillo y opossum (Tabla 6 y 7).

En el discriminado de fuentes sanguíneas la mayor proporción fue para armadillo (43,8 %) seguido de cabra y gallina; opossum y equino presentaron valores entre 18,8. Menores valores fueron determinados para bovino, gato y canino (Tabla 6 y 7). Sangre humana no fue identificada en los ejemplares de *T. dimidiata* colectados en este hábitat.

Tabla 6. Distribución de hospederos de *T. dimidiata* entre los insectos reactivos (n=155) en el ELISA^a

Intradomicilio			Peridomicilio			Silvestre		
No. Insectos reactivos= 51			No. Insectos reactivos= 88			No. Insectos reactivos= 16		
Hospederos	Positivos n/%	IC95% ^b	Hospederos	Positivos n/%	IC95% ^b	Hospederos	Positivos n/%	IC95% ^b
Gallina	22/43,1	29,34-57,7	Cabra	40/45,5	34,8-56,42	Armadillo	7/43,8	19,8-70,1
Humano	16/31,4	19,1-45,9	Gallina	37/42	31,6-53,04	Cabra	6/37,5	15,2-64,6
Canino	9/17,6	8,4-30,8	Canino	19/21,6	13,5-31,6	Gallina	4/25	7,2-52,4
Cabra	8/15,7	7,0-28,6	Gato	6/6,8	2,5-14,3	Equino	3/18,8	4,0-45,64
Bovino	6/11,8	4,4-23,9	Armadillo	4/4,5	1,25-11,2	Fara	3/18,8	4,0-45,64
Gato	5/9,8	3,26-21,4	Bovino	3/3,4	0,70-9,6	Bovino	2/12,5	1,55-38,3
Equino	5/9,8	3,26-21,4	Equino	2/2,3	0,27-7,96	Canino	1/6,3	0,16-30,2
Armadillo	2/3,9	0,47-13,5	Humano	1/1,1	0,028-6,2	Gato	1/6,3	0,16-30,2
Fara	2/3,9	0,47-13,5	Fara	1/1,1	0,028-6,2	Rata	0/0	0-20,6
Rata	1/1,9	0,04-10,4	Rata	1/1,1	0,028-6,2	Humano	0/0	0-20,6
Ovino	0/0	0-6,98	Ovino	0/0	0-4,1	Ovino	0/0	0-20,6
Porcino	0/0	0-6,98	Porcino	0/0	0-4,1	Porcino	0/0	0-20,6

^a Las categorías no son exhaustivamente, ni mutuamente excluyentes debido a las alimentaciones múltiples en algunos insectos, por lo tanto el porcentaje de positividad total es mayor de 100.

^b Intervalo de confianza del 95% (binomial exacta)

Se determinaron diferencias significantes al comparar las proporciones de los hospederos identificados en los insectos colectados en todos los hábitats de la zona de estudio ($\chi^2 = 82,04$ gl = 29 $P < 0,000$) (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias observadas y esperadas de los insectos reactivos en el ELISA para los diferentes hospederos en los tres hábitats de estudio

Hospedero	Intradomicilio			Peridomicilio			Silvestre			Total	χ^2	P	gl ^c
	O ^a	E ^b	(O _i -E _i) ² /E _i	O ^a	E ^b	(O _i -E _i) ² /E _i	O ^a	E ^b	(O _i -E _i) ² /E _i				
Armadillo	2	4,55	1,43	4	6,82	1,17	7	1,6	18,22	13	20,82	0,00	2
Fara	2	2,10	0,004	1	3,2	1,51	3	0,7	7,55	6	9,07	0,01	2
Rata	1	0,70	0,128	1	1,05	0,002	0	0,2	0,2	2	0,33	0,84	2
Bovino	6	3,85	1,20	3	5,8	1,35	2	1,36	0,30	11	2,85	0,24	2
Cabra	8	18,9	6,3	40	28,4	4,73	6	6,7	0,073	54	11,09	0,003	2
Canino	9	10,2	0,14	19	15,2	0,95	1	3,6	1,88	29	2,96	0,22	2
Equino	5	3,5	0,64	2	5,2	1,96	3	1,24	2,49	10	5,11	0,07	2
Gallina	22	22,06	0,000	37	33,1	0,45	4	7,8	1,85	63	2,31	0,31	2
Gato	5	4,2	0,152	6	6,3	0,014	1	1,49	0,16	12	0,32	0,84	2
Humano	16	5,95	16,97	1	8,9	7,01	0	2,1	2,1	17	26,08	0,00	2
Total identificaciones ^d	76			114			27			217			

^a O: observado

^b E: esperado

^c gl: Grados de libertad

^d Las categorías no son exhaustivamente, ni mutuamente excluyentes debido a las alimentaciones múltiples en algunos insectos, por lo tanto el número total de alimentaciones es mayor de 155.

Análisis global: ($\chi^2 = 82,04$ $P < 0,000$ gl=29)

Alimentaciones mixtas: éstas fueron determinadas en 24,5 % de los insectos reactivos de los tres hábitats, combinación de dos fuentes alimentarias correspondieron a 16,1 %; con tres o más hospederos se observaron en menos del 9 % de los triatomos analizados (Figura 16). Los hospederos que se encontraron en mayor combinación con los demás hospederos fueron gallina (8,4 %), cabra (7,7 %), canino (7,1), armadillo (5,2 %) y gato (4,5 %) (Tabla 8).

La identificación de dos fuentes sanguíneas fue más alta para el hábitat silvestre (37,5 %), comparado con los demás (Figura 16). En este grupo las asociaciones más frecuentes se observaron entre cabra, canino, gallina y gato con otro hospedero (Tabla 8).

Alimentaciones mixtas de *T. dimidiata* con sangre humana y de animales domésticos fue observada en cinco casos (Tabla 8). Combinación de sangre de animales silvestres y domésticos se estableció en 6,5 % de los insectos reactivos.

En domicilio y peridomicilio cabra, gallina y canino fueron los más asociados con otros hospederos; para el hábitat silvestre gallina con armadillo o fara y cabra con bovino, gato y equino fueron los más comunes (Tabla 8)

Figura 16. Alimentaciones mixtas de *T. dimidiata* en la zona de estudio

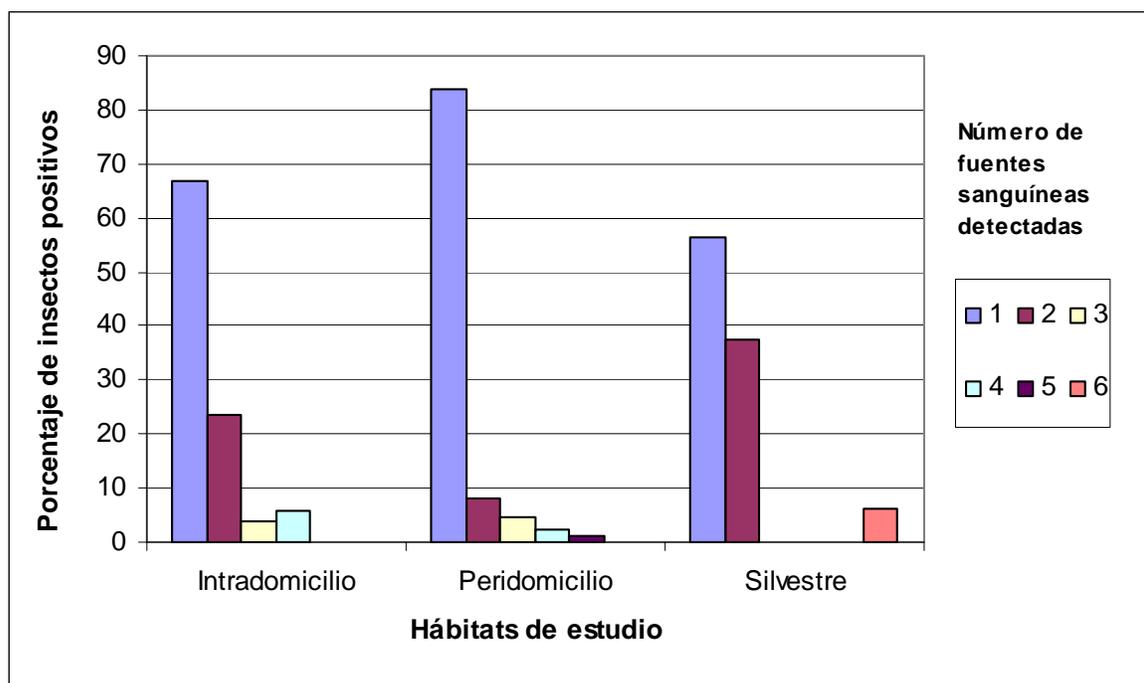


Tabla 8. Alimentaciones mixtas identificadas en *T. dimidiata* en la zona de estudio

Alimentaciones mixtas	ID		P		S		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Canino/gallina	2	3,9	3	3,4			5	3,2
Cabra/equino	2	3,9	1	1,1	1	6,3	4	2,6
Cabra/gato	1	1,9	1	1,1	1	6,3	3	1,9
Bovino/cabra					2	12,6	2	1,3
Cabra/gallina	1	1,9	1	1,1			2	1,3
Bovino/humano	1	1,9					1	0,65
Cabra/fara	1	1,9					1	0,65
Canino/gato			1	1,1			1	0,65
Canino/humano	1	1,9					1	0,65
Equino/gallina	1	1,9					1	0,65
Gallina/humano	1	1,9					1	0,65
Gato/humano	1	1,9					1	0,65
Armadillo/gallina					1	6,3	1	0,65
Fara/gallina					1	6,3	1	0,65
Bovino/canino/gallina	1	1,9					1	0,65
Gallina/gato/humano	1	1,9					1	0,65
Armadillo/canino/gato			1	1,1			1	0,65
Bovino/cabra/gato			1	1,1			1	0,65
Cabra/canino/gallina			1	1,1			1	0,65
Canino/gallina/gato			1	1,1			1	0,65
Armadillo/cabra/equino/fara	1	1,9					1	0,65
Armadillo/canino/gallina/gato	1	1,9					1	0,65
Bovino/cabra/equino/rata	1	1,9					1	0,65
Armadillo/bovino/cabra/gato			1	1,1			1	0,65
Armadillo/canino/gallina/rata			1	1,1			1	0,65
Armadillo/cabra/canino/equino/fara			1	1,1			1	0,65
Armadillo/cabra/canino/equino/fara/gallina					1	6,3	1	0,65
TOTAL	17		14		7			

ID: Intradomicilio
P: Peridomicilio
S: Silvestre

Hospederos de T. dimidiata por estadios de desarrollo: no se observaron diferencias cuando se confrontaron los diferentes estadios con cada hospedero entre hábitats ($p > 0,05$), al igual que no hubo diferencias estadísticamente significantes en las alimentaciones en los hospederos preferidos (gallina, cabra y canino).

Cuando se comparó cada fuente alimentaria en cada estadio y entre hábitats se encontraron diferencias estadísticamente significativas para machos y ninfas colectados en peridomicilio que prefirieron la sangre de cabra, en contraste con los del domicilio (Test Exacto de Fisher $p = 0,02$) y para ninfas la sangre humana del domicilio fue significante (Test Exacto de Fisher $p = 0,00$) (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución de hospederos de *T. dimidiata* por estadios de desarrollo en la zona de estudio

Hábitat	Estadios	n	Armadillo n/%	Fara n/%	Rata n/%	Bovino n/%	Cabra n/%	Canino n/%	Equino n/%	Ave n/%	Gato n/%	Humano n/%	Pos n/%	Neg n/%
ID	Hembras	43	1/7,7	0/0	0/0	1/7,7	2/15,4	3/23,1	3/23,1	7/53,9	2/15,4	3/23,1	13/30,2	30/69,8
	Machos	35	1/6,7	2/13,3	0/0	2/13,3	2/13,3	3/13,3	1/6,7	7/46,7	2/13,3	5/33,3	15/42,9	20/57,1
	Ninfas	57	0/0	0/0	1/4,3	3/13	4/17,4	3/13	1/4,3	8/34,8	1/4,3	8/34,8	23/40,4	34/59,6
Subtotal		135	2/3,9	2/3,9	1/1,9	6/11,8	8/15,7	9/17,6	5/9,8	22/43,1	5/9,8	16/31,4	51/37,8	84/62,2
P	Hembras	19	1/8,3	0/0	1/8,3	1/8,3	5/41,7	5/41,7	0/0	7/58,3	0/0	0/0	12/63,2	7/36,8
	Machos	35	1/5,3	1/5,3	0/0	0/0	10/52,6	5/26,3	1/5,3	6/31,5	0/0	0/0	19/54,3	16/45,7
	Ninfas	87	2/3,5	0/0	0/0	2/3,5	25/43,9	9/15,8	1/1,8	24/42,1	6/10,5	1/1,8	57/65,5	30/34,5
Subtotal		141	4/4,5	1/1,1	1/1,1	3/3,4	40/45,5	19/21,6	2/2,3	37/42	6/6,8	1/1,1	88/62,4	53/37,6
S	Hembras	40	3/60	1/20	0/0	0/0	1/20	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	5/12,5	35/87,5
	Machos	46	3/33,3	2/22,2	0/0	1/11,1	4/44,4	1/11,1	3/33,3	4/44,1	1/11,1	0/0	9/19,6	37/80,4
	ninfas	5	1/50	0/0	0/0	1/50	1/50	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/40	3/60
Subtotal		91	7/43,8	3/18,8	0/0	2/12,5	6/37,5	1/6,3	3/18,8	4/25	1/6,3	0/0	16/17,6	75/82,4
TOTAL		367	13/8,4	6/3,9	2/1,3	11/7,1	54/34,8	29/18,7	10/6,5	63/40,6	12/7,7	17/11	155/41,8	212/57,8

ID: intradomicilio
P: peridomicilio
S: silvestre
Pos: positivo
Neg: negativo

7. DISCUSION

La amplia diversidad de hospederos utilizados por *T. dimidiata*, provenientes de hábitats intradomiciliarios y extradomiciliarios en zonas rurales de los municipios de Capitanejo y Macaravita en Santander, evidenciaron el carácter ecléctico de esta especie como previamente fue descrito en otros estudios (Zeledón et al., 1973, 2005; Quintal & Polanco, 1977; Christensen et al., 1988; Calderón-Arguedas et al., 2001).

Los resultados de este trabajo mostraron que *T. dimidiata* utilizó como fuente de alimento a diez de los doce hospederos analizados. La variedad de fuentes sanguíneas determinada en estas poblaciones se relacionó con la presencia de hospederos vertebrados específicos en el área, considerándose que la cercanía y abundancia de éstos junto a la baja agresividad para la alimentación del vector, fueron probablemente los factores más importantes para su selección (Farfán & Angulo, 2007a,c).

Se observó que *T. dimidiata* se alimentó preferencialmente en gallinas, cabras y caninos en los diferentes hábitats, probablemente por la mayor disponibilidad de estos animales en la zona. En este trabajo la más alta frecuencia para gallinas (40,6 %) fue concordante con trabajos realizados en México en domicilios y peridomicilios de zonas rurales de las localidades de Izamal y Peto, en donde éste fue el principal hospedero; cabra segunda en frecuencia, se observó con valores mucho más bajos en la localidad de Izamal (Quintal & Polanco, 1977).

Las proporciones de alimentaciones de *T. dimidiata* en canino (18,7 %) observadas en los diferentes hábitats en este estudio fueron bajas comparadas con la de otros trabajos realizados en Costa Rica en vectores de hábitats peridomiciliarios (Zeledón et al., 2005; Calderón-Arguedas et al., 2001), probablemente por la mayor disponibilidad de este hospedero en esta región.

La alimentación de *T. dimidiata* con sangre humana (11 %) en los diferentes hábitats de estudio mostró frecuencias más bajas comparadas con otros estudios de insectos intra y peridomiciliarios, en los cuales se determinaron alimentaciones humanas con frecuencias variables entre 32 y 67 % (Zeledón et al., 2005; Christensen et al., 1988; Calderón-Arguedas et al., 2001).

Las diferencias entre las proporciones de insectos positivos para las diferentes fuentes sanguíneas observadas en este trabajo probablemente dependen de la disponibilidad de los hospederos para los insectos en esta zona. En un trabajo realizado en Argentina con ejemplares de *T. infestans* colectados en domicilios, se observaron mayores frecuencias de alimentaciones de este vector en pollos durante la primavera y verano, hecho que directamente fue relacionado con la mayor densidad de estos hospederos durante ese período (Gurtler et al., 1996).

En las poblaciones de intradomicilio, la preferencia alimentaria de *T. dimidiata* por gallinas (43,1 %) y humanos (31,4 %) coincide con los resultados de un estudio en la provincia de Chiriqui en Panamá con insectos de hábitats domésticos y peridomésticos, cuyos valores fueron del 25,1 % y 38 % para cada uno (Christensen et al., 1988); sin embargo en ese trabajo animales silvestres como opossum y armadillo no fueron identificados, probablemente por la ausencia de estos hospederos en esos hábitats, y contrario a lo observado para las poblaciones de este estudio, estos animales se detectaron en 7,8 % de los insectos.

Los resultados de este trabajo coinciden con los de Zeledón que reporta al hospedero humano como el más prevalente en los insectos colectados del domicilio (Zeledón et al., 1973). Cuando los insectos no encuentran hospederos para su ingesta sanguínea o cuando se alteran las condiciones microclimáticas de su hábitat natural, los insectos se ven obligados a desplazarse en busca de alimento y refugio en las viviendas humanas, esta situación puede estar influyendo en la movilidad de las poblaciones de *T. dimidiata* silvestres en la zona.

La mayor frecuencia de alimentaciones de los insectos peridomiciliarios en cabras, gallinas y caninos resultó concordante con la alta disponibilidad de estos animales en la zona en el momento de las colectas y confirmada a partir de informaciones obtenidas en encuestas entomológicas previas que mostraron gran porcentaje de estas viviendas con gallineros y lugares de reposo para cabras en sus peridomicilios, en las cuales se determinó como factor de riesgo para la infestación por *T. dimidiata* la presencia de estos sitios de reposo (Angulo et al., 2004).

Ningún estudio sobre preferencias alimentarias de *T. dimidiata* en estos hábitats había mostrado la alta frecuencia de alimentación en cabras, aunque sí para aves (Christensen et al., 1988; Quintal & Polanco 1977). Como previamente han observado otros autores las alimentaciones en canino, aunque en no muy alto porcentaje, fue preferida por estas poblaciones (Quintal & Polanco 1977; Zeledón et al., 1973; Calderón-Arguedas et al., 2001).

En este mismo hábitat se encontró sangre de armadillo, opossum y rata en 4,5 %, similar a lo observado en el valle central de Costa Rica, en donde se identificaron ratas, ratones y marsupiales, no obstante con valores un poco más altos (11,6 %) (Calderón-Arguedas et al., 2001). En peridomicilios de una zona urbana en este mismo país, solamente seis especies de animales domésticos y silvestres de los 14 analizados en la prueba de precipitinas fueron establecidos como hospederos de *T. dimidiata* por Zeledón y colaboradores (Zeledón et al., 2005), probablemente por la ausencia de algunas de éstas en los lugares estudiados. El hallazgo de sangre de opossum en los insectos presentes en el peridomicilio ya había sido observado por Zeledón et al., (1973) anteriormente.

En las poblaciones de *T. dimidiata* silvestres, fue característico el hallazgo de proteínas sanguíneas de animales domésticos como cabras y gallinas y de silvestres como armadillo y opossum. En otro trabajo, se determinó en insectos de refugios silvestres de opossum como único patrón de alimentación la sangre de este marsupial (Zeledón et al., 1970), ratificándose este resultado posteriormente con el hallazgo de alimentaciones del vector en *Didelphis marsupialis*, aves y reptiles (Zeledón et al., 1975).

Estos reportes muestran el estrecho contacto de poblaciones de *T. dimidiata* silvestres con reservorios de *T. cruzi* pero no con animales domésticos como en este trabajo. Sin embargo, la presencia de proteínas sanguíneas de armadillo y opossum (en una o múltiples alimentaciones) en estos insectos resalta el carácter ecléctico de este vector en las zonas rurales de los municipios de Macaravita y Capitanejo (Farfán & Angulo, 2007a,c), que sumado a los altos índices de infección natural por *T. cruzi* previamente determinados en otros trabajos (Angulo et al., 2004) aumentan el riesgo de transmisión del parásito a las poblaciones humanas de estas zonas.

La gran diversidad y abundancia de fuentes sanguíneas en hábitats domiciliarios y peridomiciliarios consigue ser atrayente para la visita y/o colonización de *T. dimidiata* silvestre. A pesar de que algunas zonas de estos municipios son semiáridas y la población humana ha generado drásticos cambios ecológicos, existen múltiples refugios naturales relativamente cercanos a las viviendas para las poblaciones del vector y de animales silvestres y sinantrópicos; sin embargo, la población humana y de animales domésticos, pueden ser la principal fuente de alimentación para la supervivencia de las poblaciones de triatominos intra y extradomiciliarios.

Los vertebrados domésticos además de mantenerse concentrados en la vivienda y en sus alrededores, especialmente de noche; también algunos de éstos como

bovinos, equinos y caprinos reposan durante el día en pastizales, cultivos y lugares rocosos cercanos a las viviendas, convirtiéndose en hospederos de las poblaciones de *T. dimidiata* naturales de refugios silvestres, este hecho se relaciona directamente con la evidencia de hospederos domésticos en los insectos silvestres colectados en cuevas y otros refugios (Farfán & Angulo, 2007a,c).

Considerando que *T. dimidiata* es una especie de carácter silvestre, el hallazgo de sangre humana y de animales silvestres en los insectos colectados en el ambiente doméstico y peridoméstico (Zeledón et al., 1973; Quintal & Polanco, 1977) y la colonización de ecotopos artificiales (Zeledón et al., 2001a, Monroy et al., 2003b) indica movilidad de la especie entre hábitats. Sin embargo, mientras algunas poblaciones muestran una alta propensión al movimiento presumiblemente por presiones ambientales y microambientales, otros parecen no migrar en los alrededores inmediatos. Invasión estacional de casas por adultos voladores de *T. dimidiata* de ecotopos silvestres ha sido observado en la península de Yucatán, México (Dumonteil et al., 2002). Este intercambio de poblaciones silvestres y domésticas podría ser epidemiológicamente importante en la transmisión de *T. cruzi* en la zona de estudio.

Podría contemplarse que los insectos colectados en los diferentes hábitats silvestres de la zona y alimentados especialmente con proteínas sanguíneas de animales domésticos como cabra, gallina, equino y bovino, se desplazaron al peridomicilio en busca de alimento que concuerda con el hallazgo de sangre de hospederos silvestres en algunos de los colectados en peridomicilio. Sin embargo, existe la posibilidad de que algunos animales domésticos estén deambulando y reposando muy cerca de los refugios silvestres de estos insectos, como fue referido por algunos campesinos de la zona y por las observaciones realizadas por investigadores del grupo.

La alta positividad observada para el hospedero humano en intradomicilio generó diferencias significantes con los demás hábitats, sin embargo en peridomicilio los valores para este hospedero fueron más bajos de lo esperado. Poblaciones de *T. dimidiata* se están movilizandando entre domicilio y peridomicilio, evidenciado por el hallazgo de proteínas sanguíneas de especies domésticas como bovino, caprino y equino, indicando que los insectos toman su alimento por mayor disponibilidad y cercanía de estos animales a estos lugares.

Los resultados evidencian la movilidad de las poblaciones de *T. dimidiata* entre los hábitats intradomiciliarios y extradomiciliarios de la zona de estudio, lo que podría aumentar el riesgo de transmisión de *T. cruzi* a humanos, por el estrecho enlace del ciclo silvestre y doméstico involucrando el mismo vector. El hallazgo de sangre

humana y de animales silvestres como armadillo y opossum en insectos colectados en intra y peridomicilio, asociados a las altas tasas de infección por *T. cruzi* (23 % para Macaravita y 32 % para Capitanejo) (Angulo et al., 2004; Farfán et al., 2006), puede indicar que participa de una manera activa en el transporte del parásito desde el ambiente silvestre, infestando o reinfestando el domicilio.

En un estudio realizado en un área rural de Boyacá, en Colombia, con condiciones geoambientales similares a las de la zona de estudio de este trabajo y utilizando RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), también mostró el intercambio de poblaciones de *T. dimidiata* de hábitats silvestres con domésticas y peridomésticas, aunque con bajo flujo genético. Estas poblaciones silvestres podrían estar implicadas en los eventos de reinfestaciones en el área (Ramírez et al., 2005).

Una situación parecida fue identificada en una investigación realizada en poblaciones de *R. prolixus* de palmas de los llanos orientales de Colombia, utilizando las preferencias alimentarias. En este estudio se identificaron proteínas de animales silvestres, de humano y de animales domésticos en poblaciones de palmas y de silvestres en los vectores domésticos sugiriendo movilidad de las poblaciones entre estos hábitats (Farfán et al., 2005, 2007b; Angulo et al., 2006b).

Dentro del grupo de reactivos la proporción de insectos adultos positivos para proteínas de origen humano fue alta (28,6 %), comparables con los resultados de otros estudios (Zeledón et al., 1973, 2005). La relación entre adultos y proporción de hospederos reveló la tendencia de asociación de los insectos machos con las fuentes sanguíneas especialmente de cabras, más que las hembras. Observación acorde con resultados previamente obtenidos analizando el fenotipo antenal en estas mismas poblaciones, que mostraron ausencia de diferenciación en los machos que podría ser un indicador de mayor dispersión entre hábitats, brindándole a este estadio mayor oportunidad de obtener alimento sanguíneo (Monroy et al., 2003b; Arroyo et al., 2007). Las ninfas del domicilio por el contrario se relacionaron más con alimentaciones en hospederos humanos.

La presencia de proteínas sanguíneas de humano y de animales domésticos en las ninfas del domicilio sugiere movilidad de éstas entre domicilio y peridomicilio en donde se presenta mayor oportunidad y disponibilidad para la alimentación. El hallazgo de vectores adultos en intradomicilio con sangre de armadillo y fara sugiere entrada de éstos desde el exterior, probablemente originarios de ambientes silvestres, específicamente cuevas y acúmulos de rocas localizados alrededor de la vivienda más próxima. Se observa una clara relación del ciclo doméstico y silvestre basado en la identificación de las fuentes sanguíneas, así

como por las evidencias de dispersión de ninfas desde el exterior hacia las casas, como previamente fue presentado y discutido (Zeledón et al., 1973).

La capacidad invasiva de *T. dimidiata* silvestre es alta, pues se ha observado que los adultos llegan volando (presuntamente atraídos por la luz) y las ninfas caminando o posiblemente transportadas por vertebrados visitantes como fue observado anteriormente en Guatemala (Monroy et al., 2003b; Angulo et al., 2004); los hallazgos de ingesta de sangre de animales silvestres en insectos intra y peridomésticos favorecen esta apreciación.

Al igual que lo observado en este estudio para las poblaciones de *T. dimidiata* silvestres, Zeledón et al., (2001) describió un fenómeno que ocurre frecuentemente en diferentes áreas de Costa Rica, en donde estas poblaciones, constantemente invaden ecotopos artificiales en viejos o nuevos asentamientos, con parcial o completo éxito en su proceso de domiciliación.

El hallazgo de *T. dimidiata* en el peridomicilio confirma la tendencia de este insecto a invadir ecótopos artificiales, los animales domésticos como perros y gallinas en sus sitios de descanso y que permanecen en este hábitat podrían actuar como una barrera en el peridomicilio ya que son las primeras fuentes alimentarias para el insecto y son éstos frecuentemente sus primeros hospederos; además los perros pueden infectarse con *T. cruzi* fácilmente por sus hábitos lamedores (Zeledón et al., 2001a, 2005).

El elevado número y diversidad de lugares peridomiciliarios en donde *T. dimidiata* puede refugiarse genera un comportamiento exploratorio con una selección menos especializada de sus hospederos, como fue observado en este estudio por el amplio espectro de hospederos detectados, y es acorde con la asociación de mayor dispersión e invasión de los machos, por el aumento de mecanorreceptores observado en un trabajo sobre el fenotipo antenal de *T. dimidiata* en estas mismas poblaciones (Arroyo et al., 2007). Además, se ha observado que los machos tienen mayor probabilidad de dispersión a través del vuelo que las hembras, lo que les permite incursionar en diferentes hábitats.

Diversos factores relacionados con la capacidad de *T. dimidiata* para acercarse a sus hospederos, que pueden influir en su comportamiento para la alimentación, están relacionados con el tiempo que tarda en alimentarse, con su tamaño; las interrupciones frecuentes por la irritabilidad de los animales en el momento de la picadura hace que el insecto se movilice en busca de otro hospedero para completar su alimentación. Este comportamiento puede ser explicado por las

frecuentes alimentaciones múltiples observadas en la zona de estudio y como ha sido descrito anteriormente (Zeledón et al., 1973, 2005; Christensen et al., 1988).

Un comportamiento similar a la de las poblaciones de *T. dimidiata* silvestres mostrada en este estudio, ha sido determinado en varios vectores de *T. cruzi* silvestres en otras regiones de Latinoamérica. En los hábitats silvestres como cuevas, rocas y palmas los triatomos no encuentran suficiente alimento que los presiona para suplir sus requerimientos nutricionales en otros hábitats con menos competencia y mayor oportunidad de alimento como el domicilio humano y su peridomicilio.

Estudios llevados a cabo en Brasil con diferentes poblaciones de *P. megistus*, mostraron amplio eclecticismo alimentar, especialmente con marsupiales, aves y roedores en los colectados en el hábitat silvestre. Las poblaciones localizadas en ecotopos artificiales y domésticos se encontraron con alimentaciones en humano y animales silvestres, similar a este estudio, con altos valores de infección natural con *T. cruzi*.

La invasión de ecótopos artificiales y en determinadas circunstancias la colonización de los mismos, con índices de infección natural elevados y con alimentaciones en humano, son factores posibles para que ocurra transmisión. Cuando se encuentran alimentados con una sola especie, sin infección y en el peridomicilio tienen un significado epidemiológico menor (Forattini et al., 1981; Correa Rodrigues et al., 1992; Steindel et al., 1994).

En Rio de Janeiro, Brasil, estudios de preferencias alimentarias en poblaciones de *T. vitticeps* del domicilio, mostraron reactividad en armadillo, humano y cerdo (Goncalves et al., 2000), contrario a lo encontrado en este mismo estado posteriormente, en donde las mayores fuentes alimentarias para esta especie fueron humano, roedor y ave (Lorosa et al., 2003). Los resultados variables de estas investigaciones posiblemente dependieron de la disponibilidad de los hospederos en las zonas investigadas.

En el cono sur especies silvestres como *T. rubrovaria*, tienen significancia epidemiológica como vectores de *T. cruzi*, por su amplia distribución y su tendencia a invadir ambientes domésticos. En Uruguay, insectos colectados en ecótopos naturales y artificiales, mostraron como hospederos principalmente a bóvidos seguido de ave y marsupiales; los ejemplares de procedencia

peridomiciliaria y silvestre se encontraron alimentados con sangre humana (Salvatella et al., 1994), contrario a lo observado en este estudio en donde solo se detectó un caso para humano, hecho probablemente relacionado con la selección menos especializada de hospederos en este hábitat. Otros autores estudiando la misma especie en hábitats domiciliarios y extradomiciliarios, corroboraron lo anterior, aunque más asociados a hospederos sinantrópicos y domésticos (Almeida et al., 2002).

En un estudio epidemiológico con poblaciones de *R. pallescens* en Panamá en hábitats domésticos, peridomésticos y palmas (silvestres), indicó el carácter zoofílico de esta especie, que se alimenta principalmente de animales silvestres, siendo la sangre de los opossums la fuente alimentaria preferida, aunque el hombre también se ha reconocido como hospedero. Cambios ecológicos tales como la deforestación pueden causar mortalidad de los hospederos silvestres con alteración de la biocenosis, conduciendo a un pobre estado nutricional para los triatominos, que induce al insecto a buscar nuevas fuentes alimentarias en otros hábitats (Vasquez et al., 2004).

La obtención de resultados confiables e interpretables en los estudios para evaluar el comportamiento de los triatominos utilizando como herramienta la identificación de los hospederos, requieren el conocimiento de los hábitats, lugares de colecta, tipos y densidad de animales en las zonas (silvestres y domésticos). Sin embargo, factores relacionados con las características biológicas de los insectos, como capacidad alimentaria, grado de digestión de proteínas, tiempo transcurrido desde su alimentación hasta su disección en el laboratorio y vitalidad influyen en la cantidad de proteínas identificables en el intestino por las pruebas (Weitz, 1956).

Adicionalmente, las condiciones ambientales tienen un efecto considerable en la longevidad de las alimentaciones sanguíneas, ya que cambios en la temperatura o humedad pueden acelerar o retrasar la actividad metabólica de los insectos. En este trabajo algunos de los contenidos intestinales de *T. dimidiata* presentaron un alto grado de digestión, determinado por el color del contenido intestinal y sin embargo la prueba de ELISA logró identificar proteínas sanguíneas.

La absorción de anticuerpos heterólogos mejoró la especificidad de los antisueros disminuyendo la reactividad cruzada entre las diferentes especies de animales, especialmente en los mamíferos, como fue observado en otros trabajos (Burkot et al., 1981; Weitz, 1956). La apreciable disminución de los títulos de antisueros,

para algunos animales muy próximos en la escala zoológica como caprino, bovino, ovino, observado en este estudio ya había sido reportado por otros autores (Burkot et al., 1981; Weitz., 1956); no obstante, mostraron reactividad específica ante los controles positivos homólogos con títulos detectables por encima del punto de corte.

Este estudio contribuyó al conocimiento de los hábitat de *T. dimidiata*, de las asociaciones con sus hospederos y de los mecanismos de intercambio o movilidad entre los hábitat naturales y artificiales. La amplia diversidad y disponibilidad de hospederos es más estable en las viviendas y peridomicilios y brindan excelentes refugios para los insectos procedentes de hábitats silvestres.

Finalmente es importante tener en cuenta que para interpretar mejor los resultados de los estudios tendientes a identificar los hospederos, es necesario conocer y estimar la densidad de las diferentes especies de animales en las zonas, particularmente para establecer la movilidad de los insectos entre los hábitat y su posible implicación en la transmisión de *T. cruzi* al hombre.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La necesidad de un método para la identificación de las preferencias alimentarias específicas a nivel genérico y bastante sensible, permitió en este estudio adaptar la técnica de ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbent Assay) para este propósito.
- Se determinó el carácter ecléctico de *T. dimidiata* en hábitats domiciliarios y extradomiciliarios, por la identificación de ingesta de sangre humana, de animales silvestres y domésticos, utilizando la técnica de ELISA.
- Se determinó la movilidad de las poblaciones silvestres de *T. dimidiata* hacia el domicilio y peridomicilio por el hallazgo de sangre de animales domésticos en éstos y por la presencia de sangre de animales silvestres en los insectos domésticos y peridomésticos. Estos resultados contribuyen a la comprensión de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*.
- Los resultados de este trabajo contribuyen al entendimiento del comportamiento de vectores secundarios como *T. dimidiata*, los cuales pueden reinfestar el domicilio humano en las áreas tratadas. Estos resultados evidencian el riesgo de reinfestación de las viviendas por insectos silvestres y la importancia de controlarlos debido al gran potencial de adaptación al domicilio humano y por consiguiente la transmisión de parásitos a humanos.
- La necesidad de implementar estrategias de control efectivas, obliga a conocer aspectos sobre la biología, eco-epidemiología y grado de dispersión entre las poblaciones silvestres y domiciliadas para comprender las actuales implicaciones epidemiológicas de la enfermedad de Chagas.
- Considerando que la disponibilidad de hospederos es la causa aparente de las preferencias alimentarias en *T. dimidiata*, se hace necesario en próximos estudios determinar con precisión el número y densidad de hospederos en todos los hábitats, en un tiempo de monitoreo que indique las variaciones estacionales de las poblaciones de *T. dimidiata* entre sus hábitats que afectan su dispersión y movilidad. Además de otros estudios que relacionen esos factores con las tasas de infección natural por *T. cruzi* en los insectos y en los

hospederos y su relación con la infección humana, que permitirán una visión más amplia y específica de la dinámica de transmisión y su impacto epidemiológico.

BIBLIOGRAFIA

Abad-Franch F, Aguilar V HM, Paucar CA, Lorosa ES, Noireau F. Observations on the domestic ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2002;97(2):199-202.

Almeida CE, Duarte R, do Nascimento RG, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: Trophic resources and ecological observations of five populations collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2002;97(8):1127-1131.

Angulo VM, Tarazona Z, Arismendi MJ, Joya MI, Sandoval CM. Distribución de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) domiciliarios en 27 municipios de Santander. En: Memorias Congreso Internacional Investigación y Salud. Bogotá. **Biomédica**; 1997;17(supl 1):79.

Angulo VM, Tarazona Z, Reyes A, Gutiérrez R, Sandoval CM. Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y la Cardiopatía Infantil. Nodo Nor-Oriental-CINTROP UIS (Arauca-Norte de Santander-Santander). En: Memorias Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana, Bucaramanga, Julio 1999. p. 99-108

Angulo VM, Esteban L, Martínez M, Flórez M. Reduction of costs for surveillance entomology & intervention with insecticides for control of *Triatoma dimidiata*. Informe final. Project A 10400 Chagas operational research. 2004.

Angulo VM. Comportamiento de *Triatoma dimidiata*: un reto para su control. En: Resúmenes XII Congreso de Parasitología y Medicina Tropical. Bogotá. **Biomédica**;2005a:80-82.

Angulo VM. Ensayo de estrategias y vigilancia de *Triatoma dimidiata*, en Colombia. En: Guhl F editor. Memorias Primer Taller internacional sobre control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Bogotá 2005b:91-102.

Angulo VM, Dotson E, Luna KP, Esteban L, Farfán AE. Estudio de las características eco-biológicas y genéticas de poblaciones silvestres y domiciliadas de *Triatoma dimidiata* en Santander y sus implicaciones en el diseño de estrategias de control. Informe final. Colciencias, 2006a.

Angulo VM, Farfán AE, Esteban L. *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae) en palmas peridomiciliarias en los llanos orientales de Colombia. Riesgo epidemiológico y estrategias de control. En: Resúmenes Congreso Alternativas de mejoramiento de la vivienda para la prevención del chagas en el departamento de Casanare. Yopal, 2006b.

Angulo VM, Esteban L. Evidencias morfológicas del proceso de adaptación de *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:Reduviidae) silvestres hacia los domicilios humanos en los Llanos Orientales de Colombia. XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología-FLAP. Venezuela, Aceptado. Octubre, 2007.

Arroyo CM, Esteban L, Catala S, Angulo VM. Variación del fenotipo antenal de poblaciones del domicilio, peridomicilio y silvestres de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) en Santander, Colombia. **Biomédica** 2007;27(1):92-100.

Boakye DA, Tang J, Truc P, Merriweather A, Unnasch TR. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. **Med Vet Entomol** 1999;13(3):282-287.

Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera:Reduviidae) in Ceara State, Northeastern Brazil. **Acta Tropica** 2005;93:119-126.

Bosseno MF, Garcia LS, Baunaure F, Gastelum EM, Gutierrez MS, Kasten FL, Dumonteil E, Breniere SF. Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg** 2006;74(2):303-305.

Burkot TR, Goodman WG, De Foliart GR. Identification of mosquito blood meals by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Am J Trop Med Hyg** 1981;30(6):1336-1341.

Calderón-Arguedas O, Chinchilla M, García F, Vargas M. Preferencias alimentarias de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de la meseta central de Costa Rica a finales del siglo XX. **Parasitología al Día** 2001;25(3-4):78-81.

Christensen HA, Sousa OE, Vasquez AM. Host feeding profiles of *Triatoma dimidiata* in peridomestic habitats of western Panamá. **Am J Trop Med Hyg** 1988;38(3):477-479.

Correa Rodrigues VLC, Ferraz ANF, da Rocha EO, Castor de Lima VL. Prevalencia, índices de infección e hábitos alimentares de triatomíneos capturados em uma área de vigilância epidemiológica. **Rev Soc Bras Med Trop** 1992;25(3):183-190.

Corredor A, Santacruz MM, Páez S, Guatame LA. Distribución de los triatominos domiciliados en Colombia. Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud. Bogotá, 1990:144.

Costa J, de Almeida JR, Britto C, Duarte R, Marchon-Silva V, Pacheco Rda S. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasilienses* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 1998;93(1):7-13.

Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, Beard CB. The Epidemiologic Importance of *Triatoma brasiliensis* a Chagas Disease Vector in Brazil: a Revision of Domiciliary Captures during 1993-1999. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2003;98(4):443-449.

Crowther JR. The ELISA guidebook. Methods in Molecular Biology. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2001.

Cruz-López L, Malo EA, Rojas JC, Morgan ED. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. **Med Vet Entomol** 2001;15:351-357.

D'Alessandro A, Barreto P, Saravia N, Barreto M. Epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in the oriental plains of Colombia. **Am J Trop Med Hyg** 1984;33(6):1084-1095.

de Oliveira AW, da Silva IG. Distribución geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007;40(2):204-208.

Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D, Monroy C. The chagas vector, *Triatoma dimidiata*, (Hemiptera:Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. **J Med Entomol** 2003;40(4):436-440.

Dorn P, Monroy C, Curtis A. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. **Infection, Genetics and Evolution** 2007;7:343-352.

Duarte R. Ensaio imunoenzimático ELISA para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister 1835) (Hemiptera: Reduviidae). Tese de mestrado em Biologia Celular e Molecular IOC / Fundação Oswaldo Cruz, 1997:103pp

Dumontiel E, Gourbiere S, Barrera-Perez M, Rodriguez-Felix E, Ruiz-Piña H, Baños-Lopez O, Ramirez-Sierra MJ, Menu F, Rabinovich JE. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan Peninsula of Mexico. **Am J Trop Med Hyg** 2002;67(2):176-183.

Dumontiel E, Gourbiere S. Predicting *Triatoma dimidiata* abundance and infection rate: a risk map for natural transmission of Chagas disease in the Yucatan Peninsula of Mexico. **Am J Trop Med Hyg** 2004;70(5):514-519.

Farfán AE, Gutierrez R, Sandoval CM, Castellanos J, Rodríguez L, Angulo VM. Estandarización de la prueba inmunoenzimática ELISA para la identificación de las fuentes alimentarias de los triatominos en Colombia. En: XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical; Nov. 3-6; Bogotá: Biomédica; 2005;25(supl 1):93-94.

Farfán AE, Esteban L, Luna KP, Angulo VM. Hospederos e infección natural de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) en hábitat domiciliarios y extradomiciliarios en Santander, Colombia. En: Resúmenes XXXIII Congreso de Entomología SOCOLEN, Sociedad Colombiana de Entomología. Manizales, 2006:97.

Farfán AE, Angulo VM. Patrones alimentarios de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en un área endémica de Santander, Colombia. En: Resúmenes XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología-FLAP, Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Maracay, Venezuela, Octubre, 2007a.

Farfán AE, Esteban L, Angulo VM. Hospederos de *Rhodnius prolixus* del domicilio y palmas en los Llanos Orientales de Colombia. En: Resúmenes XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología-FLAP, Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Maracay, Venezuela, Octubre, 2007b.

Farfán AE, Angulo VM. Patrones alimentarios de poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de domicilio, peridomicilio y silvestres en una zona endémica de Santander, Colombia. Resúmenes XIII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Ibagué, Noviembre, 2007c.

Feliciangeli MD, Carrasco H, Patterson JS, Suarez B, Martinez C, Medina M. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. **Am J Trop Med Hyg** 2004;71(4):501-505.

Feliciangeli MD, Sanchez-Martin M, Marrero R, Davies C, Dujardin JP. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). **Acta Tropica** 2007;101:169-177.

Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF, Silveira AC. Habitos alimentares, infeccao natural e distribuicao de triatomineos domiciliados na regio nordeste do Brasil. **Rev Saude Publ**, Sao Paulo 1981;15:113-164

Forattini OP, Barata JM, Santos JL, Silveira AC. Feeding habits, natural infection and distribution of domiciliary triatominae in the central region of Brazil. **Rev Saude Publica** 1982;16(4):171.204.

Freitas SPC, Lorosa ES, Rodrigues DCS, Freitas ALC, Goncalves TCM. Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no Estado do Ceara, Brasil. **Rev Saude Publica** 2005;39(1):27-32.

Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2000;95(4):557-565.

Gomes LA, Duarte R, Lima DC, Diniz BS, Serrao ML, Labarthe N. Comparison between precipitin and ELISA tests in the detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2001;96(5):693-695.

Goncalves TCM, Rocha DS, Cunha RA. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the state of Rio de Janeiro, Brasil. **Rev Saude Publica** 2000;34(4):348-352.

Guhl F, Vallejo GA. Interruption of Chagas disease transmission in the Andean Countries: Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. 1999;94(1):413-415.

Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae:Triatominae) en Colombia. **Biomédica** 2007;27(1):143-162.

Gurgel-Goncalves R, Ármalo ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba CAC. Enzootic transmisión of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the federal district of Brazil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo 2004;46(6):323-330.

Gurtler RE, Cecere MC, Vazquez D, Chuit R. Shifting host choices of the vector Chagas disease *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) in northwest Argentina: seasonal and instar variation. **J Med Entomol** 1996;33:15-26.

Gurtler RE, Cohen JE, Cecere MC, Lauricella MA, Chuit R, Segura EL. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. **Am J Trop Med Hyg** 1998;58(6):748-758.

Hashimoto K, Córdón-Rosales C, Trampe R, Kawabata M. Impact of single and multiple residual sprayings of pyrethroid insecticides against *Triatoma dimidiata*

(Reduviidae:Triatominae), the principal vector of Chagas Disease in Jutiapa, Guatemala. **Am J Trop Med Hyg** 2006;75(2):226-230.

Johnstone A, Thorpe R. Immunochemistry in practice. In: Production of antibodies. 2th ed. Blackwell Scientific Publications. London, 1987;31-34.

Kent RJ, Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. **Am J Trop Med Hyg** 2005;73(2):336-342.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas disease. **Bull Am Mus Nat Hist** 1979;163:127-250.

Lorosa ES, Valente MVMP, Cunha V, Lent H, Jurberg J. Foco de doença de Chagas em Arcádia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. 2003;98(7):885-887.

McKinney RM, Spillane JT, Holden P. Mosquito blood meals: identification by a fluorescent antibody method. **Am J Trop Med Hyg** 1972;21(6):999-1003.

Microsoft® Office Excel 2003. Parte de Microsoft Office Professional Edition 2003

Moncayo A. Chagas Disease: current epidemiological trends alter the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2003;98(5):577-591.

Monroy C, Rodas A, Mejia M, Rosales R, Tabaru Y. Epidemiology of Chagas disease in Guatemala: infection rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2003a;98(3):305-310.

Monroy MC, Bustamante DM, Rodas AG, Enriquez ME, Rosales RG. Habitats, dispersión and invasión of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Peten, Guatemala. **J Med Entomol** 2003b;40:800-806.

Nakagawa J, Cordón-Rosales C, Juárez J, Itzep C, Nonami T. Impact of residual spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the Department of Zacapa in Guatemala. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. 2003;98(2):277-281.

Noireau F, Breniere F, Ordoñez J, Cardozo J, Morochi W, Gutierrez T, Bosseno MF, Garcia S, Vargas F, Yaksic N, Dujardin JP, Peredo C, Wisnivesky-Colli C. Low probability of transmission of *Trypanosoma cruzi* to humans by domiciliary *Triatoma sordida* in Bolivia. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1997;91:653-656.

Ponce C. Current situation of Chagas disease in Central America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. 2007 Aug 10; en prensa.

Quintal RE, Polanco G. Feeding preferences of *Triatoma dimidiata maculipennis* in Yucatan, Mexico. **Am J Trop Med Hyg** 1977;26(1):176-178.

Rabinovitch, J.E. Ecología poblacional de los triatominos. In: Carcavallo RV, Rabinovitch JE, Tonn RJ eds. Factores biológicos y ecológicos de la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Servicio Nacional de Chagas, 1985.v.1,p.121-47.

Ramirez CJ, Jaramillo CA, Delgado MP, Pinto NA, Aguilera G, Guhl F. Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:Reduviidae) from an endemic zone of Boyacá, Colombia. **Acta Tropica** 2005;93:23-29.

Reyes M, Angulo VM, Sandoval CM. Efecto tóxico de B-cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Ericsson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). **Biomédica** 2007;27(supl.1):75-82.

Romaña C. Utilization de la méthode des precipitines pour l'identification du sang ingerée par certains reduvides. **Bull Soc Path Exot** 1939;32(6):625-628.

Salvatella R, Calegari L, Pume A, Basmadjian Y, Rosa R, Guerrero J, Martínez M, Mendaro G, Briano D, Montero C, Wisnivesky-Colli C. Perfil alimentario de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843) (Hemiptera, Triatominae) en ambitos peridomiciliarios, de una localidad rural de Uruguay. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo 1994;36(4):311-320.

Sandoval CM, Duarte R, Gutierrez RM, Silva DR, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvao C. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (hemiptera, reduviidae, Triatominae) from Dwellings in Cesar, Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2004;99(2):137-140.

Sarquis O, Sposina R, de Oliveira TG, Mac Cord JR, Cabello PH, Borges-Pereira J, Lima MM. Aspects of peridomiliary ecotopes in rural areas of northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 2006;101(2):143-147.

Schofield CJ (Editor). Sistemática y distribución de los triatominos. In: Triatominae. Biología y control. 1994:17-30.

Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999;94(1):375-8.

Schofield CJ. Biosystematics and evolution of the Triatominae. **Cad Saude Publica** 2000;16(2):89-92.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology** 2006;22(12):583-88.

Siqueira AF. Estudos sobre a reação de precipitina aplicada a identificação de sangue ingerido por triatomíneos. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo 1960;2:41- 53.

Stat Soft, Inc. 2004 STATISTICA (data analysis software system), version 7.0. www.statsoft.com

Starr MD, Rojas JC, Zeledón R, Hird DW, Carpenter TE. Chagas' disease: risk factors for house infestation by *Triatoma dimidiata*, the major vector of *Trypanosoma cruzi* in Costa Rica. **Am J Epidemiol** 1991;133(7):740-747.

Stata corp. 2005. Stata Statistical Software: Release 9.1. Collage Station, TX: StataCorp LP.

Steindel M, Toma HK, Carvalho Pinto CJ, Grisard EC, Shlemper JR BR. Colonizacão de ecótopos artificiais pelo *Panstrongylus megistus* na ilha de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo 1994;36(1):43-50.

Svobodová M, Sádlová J, Chang KP, Petr Volf. Short report: distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in sanliurfa, Turkey. **Am J Trop Med Hyg** 2003;68(1):6-9.

Vasquez AN, Samudio FE, Saldaña A, Paz HM, Calzada JE. Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo 2004;46(4):217-222.

Vázquez DP, Canale D, Gurtler RE. Effects of non-susceptible hosts on the infection with *Trypanosoma cruzi* the vector *Triatoma infestans*: an experimental model. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro 1999;94(3):413-419.

Villela MM, Souza JB, Mello VP, Azeredo BV, Dias JC. Vigilância entomológica da doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. **Cad Saúde Pública** 2005;21(3):878-886.

Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. **Trans Roy Soc Trop Med and Hyg** 1976;70(2):98-106.

Weitz B. Identification of blood meals of blood-sucking arthropods. **Bull World Health Organ** 1956;15:473-90.

Zeledón R, Solano G, Sáenz G, Swatzwelder JC. Wild reservoirs of *Trypanosoma cruzi* with special mention of the opossum, *Didelphis marsupialis*, and its role in the epidemiology of Chagas disease in an endemic area of Costa Rica. **J Parasitol** 1970;56:38.

Zeledón R, Guardia V, Zúñiga A, Swatzwelder JC. Biology and ethiology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). III. Habitat and blood sources. **J Med Entomol** 1973;10:363-370.

Zeledon R, Solano G, Burstin L, Swartzwelder JC. Epidemiological pattern of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. ***Am J Trop Med Hyg*** 1975;24(2):214-25.

Zeledon R, Montenegro VM, Zeledon O. Evidence of colonization of Man-made ecotopes by *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) in Costa Rica. ***Mem Inst Oswaldo Cruz***, Rio de Janeiro 2001a;96(5):659-660.

Zeledon R, Ugalde JA, Paniagua LA. Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. ***Mem Inst Oswaldo Cruz***, Rio de Janeiro 2001b;96(6):757-764.

Zeledón R, Calvo N, Montenegro VM, Lorosa ES, Arévalo C. A survey on *Triatoma dimidiata* in an urban area of the province of Heredia, Costa Rica. ***Mem Inst Oswaldo Cruz***, Rio de Janeiro 2005;100(6):607-612.

Zeledon R, Rojas JC. Environmental management for the control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), (Hemiptera; Reduviidae) in Costa Rica: a pilot project. ***Mem Inst Oswaldo Cruz***, Rio de Janeiro 2006;101(4):379-386.

ANEXO A

TITULACION DE ANTISUEROS MEDIANTE ELISA

Para determinar los títulos de los antisueros policlonales producidos se estandarizó la técnica de ELISA, estableciendo las concentraciones mínimas de los reactantes para la prueba, así como los tiempos de incubación, tiempo y forma de lavados y bloqueos.

Se sometieron diluciones de sueros al doble desde 1/1.000 hasta 1/16.000, frente a diluciones de antisueros homólogos seriadas desde 1/1.000 hasta 1/2.048.000 y conjugado en diluciones desde 1/2.000 hasta 1/16.000. Después de establecer las condiciones para el ELISA, finalmente el protocolo que se utilizó para las titulaciones de los antisueros fue el siguiente:

Microplacas de poliestireno de 96 pozos (Maxisorp NUNC[®], Denmark) fueron sensibilizadas con 100 ul de sueros diluidos desde 1/16.000 en buffer carbonatos pH 9,6, que fueron incubados por dos horas a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 0,05% (PBS -Tween) pH 7,2, se añadieron los antisueros diluidos desde 1/1.000 hasta 1/2.048.000 en pozos dobles y por separado para cada antisuero; en este paso las placas fueron incubadas a 37 °C durante una hora. Posterior a otros lavados, se añadió anti-IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina (SIGMA[®]) diluida 1/4.000 y después de otra incubación y lavado se agregó el sustrato p-nitrofenilfosfato (SIGMA[®]), dejándose en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción enzimática fue detenida con NaOH 3M y las lecturas fueron hechas en un lector de ELISA (Anthos 2020[®]) a 405 nm con filtro de referencia de 620 nm.

Este mismo procedimiento fue realizado para los antisueros absorbidos pero diluciones de los sueros 1/200 y los antisueros en diluciones dobles desde 1/100 hasta 1/102.400; el conjugado se utilizó 1/2.000. Los demás pasos en el ELISA se realizaron de la misma manera que para los antisueros no absorbidos.

Se determinaron los radios de unión BR (Binding ratios) de cada antisuero para establecer su punto final en la titulación, dividiendo la densidad óptica del antisuero en la densidad óptica del negativo, en este caso el blanco.

ANEXO B

PURIFICACION DE ANTISUEROS POLICLONALES

Para la purificación de los antisueros policlonales producidos, se realizaron procedimientos de absorción en medio líquido según la metodología de Weitz (1956). El protocolo original presentado por este autor fue modificado para mejorar la especificidad de los antisueros en este trabajo.

1. Una mezcla de partes iguales de suero de armadillo, bovino, cabra, canino, equino, fara, ave, gato, humano, ovino, porcino y rata se mezcló para formar pools. A cada pool no se le agregó el suero homólogo del antisuero que se pretendía absorber. Por ejemplo: para absorber antisuero humano, se agregaron todos los demás excepto éste.
2. Se prepararon doce pools diferentes, cada pool se componía de un volumen de 30 ul de cada suero (11 sueros); éstos se marcaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.
3. Cada antisuero a absorber se diluyó en 1/50, 1/100 y 1/200 en PBS pH 7.2. Se prepararon 2000 ul de cada dilución
4. Se tomó una parte del pool de sueros (antígeno) respectivo con 100 partes del antisuero a absorber previamente diluido. Como cada antisuero ya se había diluido en un volumen final de 2.000 ul, entonces a éste se le agregaron 20 ul de cada pool.
5. Posteriormente se agitó en vortex y luego en el agitador de placas durante 30 minutos.
6. Se incubaron a 37°C por 2 horas y luego se dejaron a 4°C toda la noche
7. Posteriormente, se centrifugaron a 5.000 g por 15 minutos, el sobrenadante se recuperó en otro vial y el sedimento fue descartado.
8. El sobrenadante de cada antisuero absorbido se almacenó a -20°C.

9. Luego del primer proceso de absorción se realizaron titulaciones y pruebas cruzadas para determinar concentración y especificidad. Si en las pruebas cruzadas se encontraba reactividad con sus heterólogos, este proceso se repetía hasta que se eliminaran los anticuerpos inespecíficos.

ANEXO C

CURVA DE CALIBRACION DE PROTEINAS PROTOCOLO

Para hacer determinar la concentración de proteínas de los antisueros se realizaron curvas de calibración de proteínas en $\mu\text{g/ml}$ y mg/ml .

Se utilizó el reactivo de Bradford del kit Quick Star Bradford de Bio-rad[®], la albúmina bovina correspondió al estándar.

Se siguió el protocolo establecido por la casa comercial y se realizaron 3 curvas de calibración con diferentes concentraciones del estándar: 0,025-1 mg/ml , 1-30 $\mu\text{g/ml}$ y 40-100 $\mu\text{g/ml}$, con linealidades entre 0,05 a 0,5 mg/ml y de 8 a 80 $\mu\text{g/ml}$.

Para la elaboración de cada curva de calibración se utilizaron diferentes concentraciones del estándar. Este proceso se realizó por triplicado, con el fin de obtener la mejor linealidad en las curvas.

A continuación se muestran algunas de las curvas de calibración utilizadas para determinar la concentración de proteínas de los antisueros y controles en este trabajo (Figuras 17, 18 y 19):

Figura 17. Curva de calibración de proteínas de 0,025-1 mg/ml

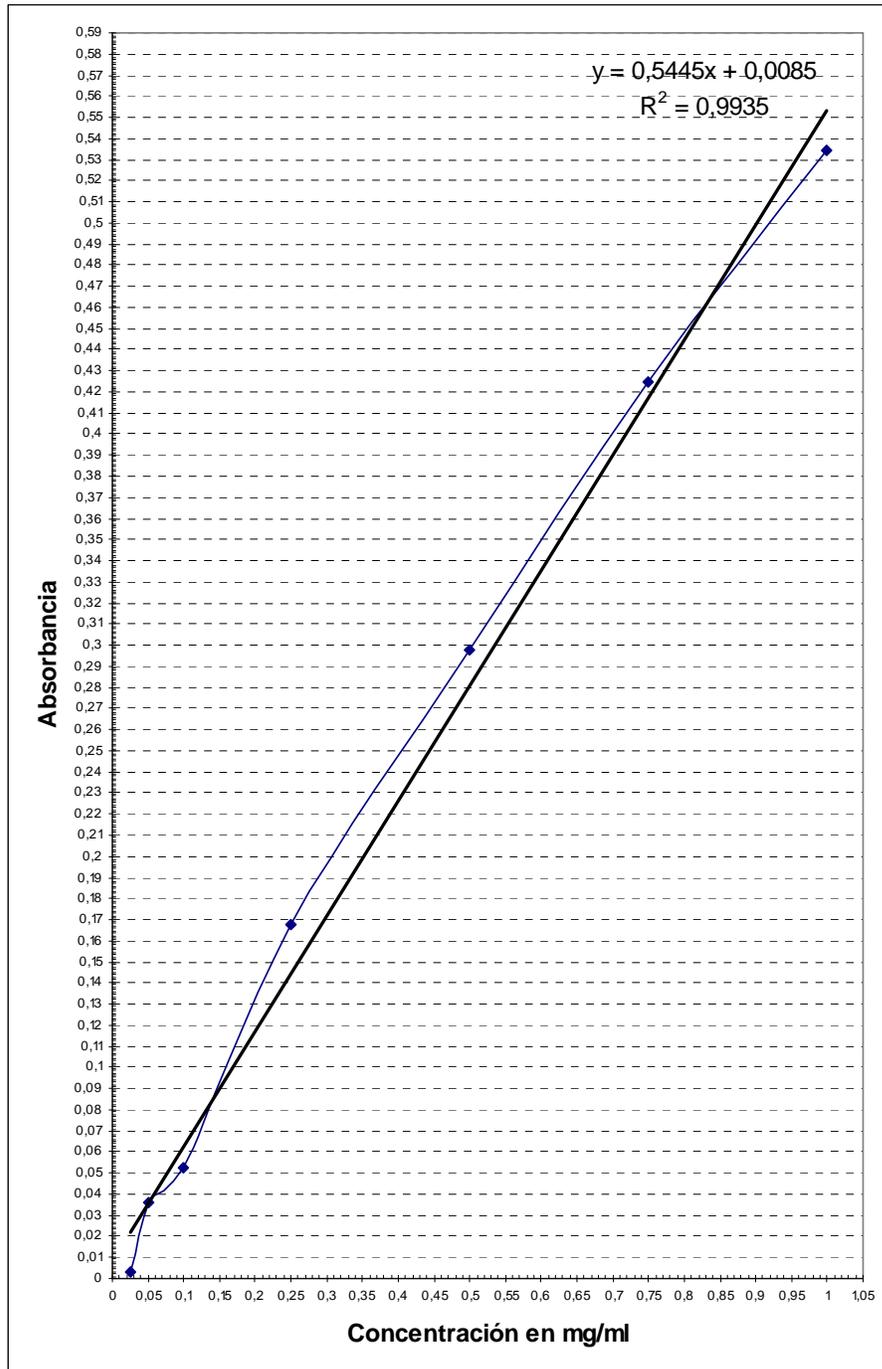


Figura 18. Curva de calibración de proteínas en 1-30 µg/ml

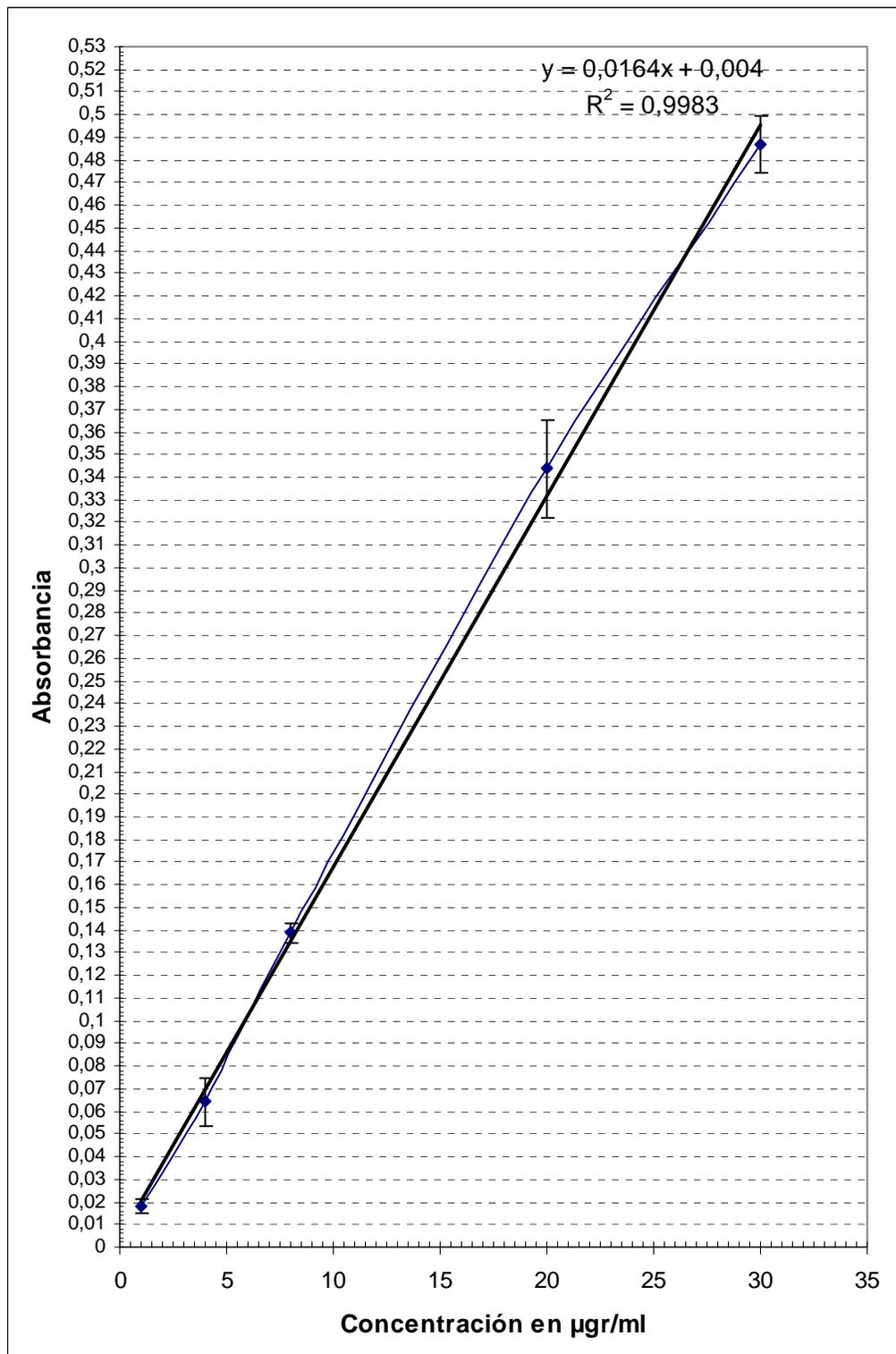
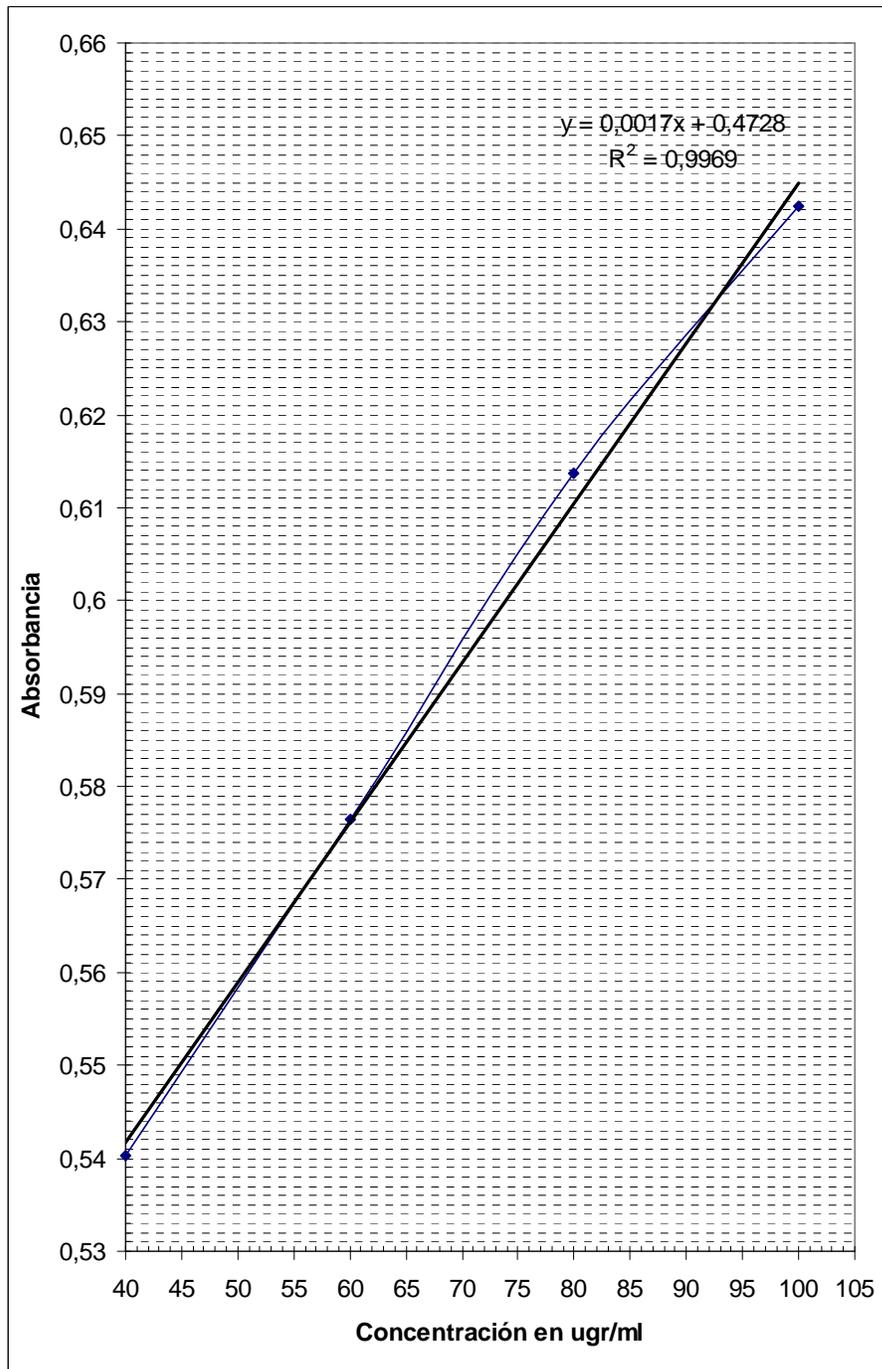


Figura 19. Curva de calibración de proteínas en de 40-100 µg/ml



ANEXO D

ELISA PARA LA DETECCIÓN DE HOSPEDEROS DE *Triatoma dimidiata*

Para determinar los hospederos de *T. dimidiata* se estandarizó la técnica de ELISA, estableciendo las concentraciones mínimas de los reactantes para la prueba, así como los tiempos de incubación, tiempo y forma de lavados y bloqueos. El protocolo final fue el siguiente:

Microplacas de poliestireno de 96 pozos (Maxisorp NUNC[®], Denmark) fueron sensibilizadas con 100 ul de los contenidos intestinales de los insectos diluidos 1/50 en buffer carbonatos pH 9,6 (en las filas A-G), estas placas fueron incubadas por dos horas a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 0,05% (PBS - Tween) pH 7,2, en lavador de placas automático Bio-rad[®], se añadieron los antisueros absorbidos diluidos 1/50 con PBS-Tween 20 0,05%-albúmina 3%, en cada una de las columnas 1-12; en este paso las placas fueron incubadas a 37 °C durante una hora. Posterior a otros lavados, se añadió anti-IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina (SIGMA[®]) diluida 1/2.000 y después de otra incubación y lavado se agregó el sustrato p-nitrofenilfosfato (SIGMA[®]), dejándose en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos.

La reacción enzimática fue detenida con NaOH 3M y las lecturas fueron hechas en un lector de ELISA (Anthos 2020[®]) a 405 nm con filtro de referencia de 620 nm. Cada placa fue procesada con sus respectivos blancos, controles positivos y negativos. Reacciones por encima del punto de corte preestablecido se consideraron positivas para el antisuero respectivo.