

EFFECTO INSECTICIDA DE LAMBDAHALOTRINA Y
FENITROTIÓN SOBRE DOS CEPAS DE *Panstrongylus geniculatus*
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE)

FLOR ANGELA TORRES PIMIENTO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

BUCARAMANGA

2013

EFFECTO INSECTICIDA DE LAMBDAHALOTRINA Y
FENITROTIÓN SOBRE DOS CEPAS DE *Panstrongylus geniculatus*
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE)

FLOR ANGELA TORRES PIMIENTO

TRABAJO DE POSGRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR: VÍCTOR MANUEL ANGULO SILVA M.Sc

CODIRECTORA: MARLENE REYES JEREZ. BIÓLOGA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

BUCARAMANGA

2013

DEDICO ESTE TRIUNFO A DIOS POR SER MI TODO, POR
LLENARME DE SU AMOR ETERNO, SU PAZ Y SU GOZO, POR
DARME FUERZAS PARA OBTENER ESTE LOGRO
POR QUE CON ÉL SOMOS MÁS QUE VENCEDORES.

A MI FAMILIA POR SU APOYO Y CARIÑO

AGRADECIMIENTOS

A Dios por dármelo todo

A mí familia por su apoyo y confianza

Al Doctor Víctor Manuel Angulo y la Bióloga Marlene Reyes por la dirección, asesoría y apoyo en la realización de este trabajo y por darme la oportunidad de ingresar al grupo de Investigación en Entomología del CINTROP.

A COLCIENCIAS, código 8684 por su apoyo financiero

A la Doctora Clara Gonzáles y a la Doctora Martha Lucía Díaz junto con su grupo de investigación en Inmunología y Epidemiología molecular por su apoyo y asesoría

A la maestría en Ciencias Básicas Biomédicas por la formación académica y apoyo en la socialización de los resultados

Al biólogo Víctor Hugo Parra por su colaboración en el análisis de resultados

A la Magister Mónica Flórez por su ayuda, acompañamiento y recomendaciones

A los demás compañeros del grupo de investigación del CINTROP: Lyda, Clarita, Erika, Gustavo y Cristian por su colaboración, ánimo y compañía durante las jornadas de trabajo

Al Ingeniero Gerson Ramírez por su ayuda en la presentación del libro

Al Licenciado Ramón Chacón y compañeros de trabajo del Colegio San José de Motoso

A mis alumnos del Colegio San José de Motoso

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MARCO TEÓRICO	21
3.1. La enfermedad de Chagas	21
3.1.1. Síntomas	21
3.1.2. Formas de transmisión	22
3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.2.1. Formas celulares y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	26
3.2.2. Ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i>	28
3.2.3. Identificación de <i>T. cruzi</i> en heces de triatominos	28
3.3. <i>Panstrongylus geniculatus</i>	29
3.3.1. Ciclo de vida de <i>P. geniculatus</i>	30
3.3.2. Hábitos de comportamiento	32
3.3.3. Distribución de <i>P. geniculatus</i>	33
3.3.4. Intrusión de <i>P. geniculatus</i> a los ambientes urbanos	34
3.3.5. <i>P. geniculatus</i> y Chagas oral	35
3.4. Tratamiento de la enfermedad de Chagas	38
3.5. Control de la transmisión de la enfermedad de Chagas	38
3.5.1. Control Físico	39
3.5.2. Control Cultural	40
3.5.3. Control Químico	40
3.6. Insecticidas	42
3.6.1. Efecto Neurotóxico de los insecticidas	42
3.6.1.1. Sitio de acción de los insecticidas	44

3.6.1.2. Susceptibilidad y resistencia a insecticidas	45
3.6.1.3. Mecanismos de resistencia a insecticidas	47
3.7. Organofosforados	51
3.7.1. Fenitrotión	52
3.8. Piretroides	53
3.8.1. Lambdacihalotrina	56
4. MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1. Obtención de una colonia de campo de <i>P. geniculatus</i> utilizando diferentes métodos de captura	57
4.1.1. Zona de muestreo	57
4.1.2. Métodos de captura	58
4.1.3. Condiciones ambientales	63
4.1.4. Recolección del material	64
4.1.5. Colonización y cría de laboratorio	64
4.1.6. Cría de ninfas para ensayos biológicos	65
4.2. Determinación de la infección natural por <i>T. cruzi</i> en la población de campo de <i>P. geniculatus</i>	66
4.2.1. Examen directo	67
4.2.2. Extracción de ADN y PCR	67
4.3. Líneas bases de susceptibilidad de los insecticidas en ninfas susceptibles de primer estadio de <i>P. geniculatus</i>	71
4.3.1. Material entomológico	71
4.3.2. Insecticidas	72
4.3.3. Técnica de aplicación tópica	73
4.3.4. Criterio de muerte	74
4.3.5. Análisis estadístico	74
4.4. Perfiles de resistencia a los principios activos de los insecticidas en ninfas de primer estadio de una cepa de campo de <i>P. geniculatus</i>	75
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	77

6. RESULTADOS	79
6.1. Obtención de una colonia de campo de <i>P. geniculatus</i> utilizando diferentes métodos de captura	79
6.1.1. <i>P. geniculatus</i> capturados	79
6.1.2. Condiciones ambientales	81
6.1.3. Colonización y cría de <i>P. geniculatus</i> de campo	81
6.2. Determinación de la infección natural por <i>Trypanosoma cruzi</i> en la población de campo de <i>P. geniculatus</i>	84
6.3. Establecimiento de las líneas bases de susceptibilidad de los insecticidas en ninfas susceptibles de primer estadio de <i>P. geniculatus</i>	86
6.4. Establecimiento de los perfiles de resistencia a los principios activos de los insecticidas en ninfas de primer estadio de una cepa de campo de <i>P. geniculatus</i>	91
7. DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA	101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: <i>P. geniculatus</i> recolectados por diferentes métodos de captura en el barrio Villa del Prado, durante el año 2011, municipio de Bucaramanga, Santander	79
Tabla 2: <i>P. geniculatus</i> recolectados por diferentes métodos de captura en la vereda Chorreras-Capitanejo, Santander	80
Tabla 3: Datos Meteorológicos CDMB, en los días de captura. Año 2011	81
Tabla 4: Porcentaje de eclosión de huevos de <i>P. geniculatus</i> 1 (N1) provenientes de Chorreras-Capitanejo, mantenidas en los sustratos: arena húmeda estéril, yeso, algodón humedecido y sin	82
Tabla 5: <i>P. geniculatus</i> recolectados en campo	
Tabla 5. Significancia de los valores del porcentaje de eclosión en diferentes sustratos en ninfas N1 de <i>P. geniculatus</i>	83
Tabla 6: Resultados de la infección natural por <i>T. cruzi</i> a través de examen directo y PCR en <i>P. geniculatus</i> recolectados en Villa del Prado, Bucaramanga y Chorreras, Capitanejo	84
Tabla 7: Nivel de susceptibilidad en ninfas de estadio 1 de <i>P. geniculatus</i> , cepa de laboratorio Molagavita 2003, y cepa de campo F1 Chorreras 2012-Capitanejo/Santander a la aplicación tópica de lambdacihalotrina (datos obtenidos con el programa POLO PLUS Probit and Logit Analysis Versión 2.0)	87
Tabla 8: Nivel de susceptibilidad en ninfas de estadio 1 de <i>P. geniculatus</i> , cepa susceptible de laboratorio y cepa de campo F1 Chorreras 2012-Capitanejo, Santander a la aplicación tópica de fenitrotión (datos obtenidos con el programa POLO PLUS Probit and Logit Analysis Versión 2.0)	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contaminación con heces y orina de reservorios y/o triatominos infectados. Transmisión Oral de la enfermedad de Chagas a humanos.	25
Figura 2: Formas intracelulares de <i>T. cruzi</i> .	26
Figura 3: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	27
Figura 4: Estadíos de desarrollo en triatominos	32
Figura 5: Ilustración de la forma de transmisión del impulso nervioso	42
Figura 6: Estructura conformacional del fenitrotión	52
Figura 7: Estructura general de los piretroides	55
Figura 8: Estructura química de la lambdacihalotrina	56
Figura 9: Zonas de muestreo de <i>P. geniculatus</i>	57
Figura 10: Socialización en el barrio Villa del prado (Bucaramanga) sobre la enfermedad de Chagas y sensibilización para la vigilancia comunitaria	58
Figura 11: Socialización con los estudiantes de la institución educativa “La Chorrera” Chorreras-Capitanejo	59
Figura 12: Trampa de luz Shannon. Barrio Villa del Prado-Bucaramanga, Vereda Chorreras-Capitanejo/Santander	60
Figura 13: Trampas con cebo animal en la vereda de Chorreras-Capitanejo	61
Figura 14: Trampa Noireau, en su interior vial con 1.5 ml de atrayente	62
Figura 15: Colecta manual de triatominos. Grupo CINTROP-UIS en Barrio Villa del Prado-Bucaramanga y en la vereda Chorreras-Capitanejo	63
Figura 16: Recipientes para la recolección de triatominos	64
Figura 17: Alimentación con sangre de gallina (<i>Gallus gallus</i>) y de ratón (<i>Mus musculus</i>) de triatominos recolectados en campo	65
Figura 18: Diferentes medios para la eclosión de las N1 de la cepa de campo	66
Figura 19: Visualización al microscopio de <i>Trypanosoma</i> sp. en heces de <i>P. geniculatus</i>	67
Figura 20: Extracción de ADN a través del método de Salting out (Miller et al., 1988) a partir de heces de triatominos	69

Figura 21: Adultos de <i>P. geniculatus</i> cepa de campo proveniente de Chorreras-Capitanejo y de <i>P. geniculatus</i> cepa de laboratorio-Molagavita 2003	73
Figura 22: Principios activos lambdacihalotrina y fenitrotión	73
Figura 23: N1 de <i>P. geniculatus</i> para ensayos con insecticidas	75
Figura 24: N1 de <i>P. geniculatus</i> afectadas por el insecticida	75
Figura 25: Amplificación de ADN de <i>T. cruzi</i> en heces de <i>P. geniculatus</i> recolectados en el Barrio Villa del Prado, Bucaramanga, Santander	85
Figura 26: Amplificación de ADN de <i>T. cruzi</i> , en heces de <i>P. geniculatus</i> recolectados en la vereda Chorreras-Capitanejo, Santander	86
Figura 27: Comparación de DL50 y DL99 a los principios activos lambdacihalotrina y fenitrotión sobre una cepa de laboratorio, de campo y una cepa adicional de <i>P. geniculatus</i> , generación 3 (F3) en ninfas 1 de <i>P. geniculatus</i>	91

RESUMEN

TÍTULO:

Efecto insecticida de lambdacihalotrina y fenitrotión sobre dos cepas de *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)*

AUTOR:

Flor Angela Torres Pimiento **

PALABRAS CLAVES:

P. geniculatus, lambdacihalotrina, fenitrotión, susceptibilidad, resistencia, potencial insecticida vigilancia comunitaria, PCR.

CONTENIDO:

Panstrongylus geniculatus, es un triatomino silvestre, intruso en domicilios humanos. Este estudio se propuso analizar la susceptibilidad a los principios activos lambdacihalotrina y fenitrotión en dos cepas (susceptible y de campo) de *P. geniculatus*. Se colectó una población de *P. geniculatus* de campo (Chorreras, Santander); usando como métodos de captura: trampas con cebo animal, captura manual y vigilancia comunitaria. Se determinó la infección natural de *Tripanosoma cruzi* por examen directo y PCR. Se estableció la línea de susceptibilidad a lambdacihalotrina y fenitrotión por aplicación tópica, en las cepas (susceptible y campo) en ninfas de primer estadio. Se halló la DL₅₀ y la DL₉₉ usando el programa POLO-PLUS; Probit and Logit Analysis Versión 2.0. Se halló el grado de resistencia: DL₅₀ cepa campo / DL₅₀ cepa laboratorio.

La efectividad de los métodos de captura fue 5, 16,78%; para captura manual, trampa de luz y vigilancia comunitaria, respectivamente. La sensibilidad para *T. cruzi* por PCR y examen directo fue de 44,4% y 33%, respectivamente. Las DL₅₀ y DL₉₉ en las cepas de campo y laboratorio, en nanogramos/insecto, fueron: 1,194; 5,764 y 0,024; 0,131 para lambdacihalotrina y 1,476; 7,354 y 0,482; 5,471 para fenitrotión, respectivamente. Los grados de resistencia fueron: GR = 48,9 para lambdacihalotrina y GR = 3,06 fenitrotión.

La vigilancia comunitaria es el método más efectivo para determinar la presencia del vector en los domicilios y peridomicilios. Se evidenció infección natural para *T. cruzi* por PCR y examen directo. La cepa de campo mostró resistencia a lambdacihalotrina y fenitrotión, influenciada por el uso de agroquímicos en la zona. Implementar medidas para la detección temprana de resistencia en triatominos es importante en el diseño de programas de control vectorial.

*Tesis de Maestría

**Facultad de Salud. Departamento de Ciencias Básicas. Maestría Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Víctor Manuel Angulo Silva Med. M.Sc

ABSTRACT

TITLE:

Insecticide effect of lambda-cyhalothrin and fenitrothion on two strains of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) *

AUTHOR:

Flor Angela Torres Pimiento**

KEY WORDS:

P. geniculatus, lambda-cyhalothrin, fenitrothion, susceptibility, resistance, insecticide potential, community surveillance, PCR

CONTENT:

Panstrongylus geniculatus, is a wild triatomine, intruder in human domiciles. This study aimed to analyze the susceptibility of two strains (susceptible and field) of *P. geniculatus*, to the active principles lambda-cyhalothrin and fenitrothion. It was collected a field strain of *P. geniculatus* (Capitanejo, Santander), using as capture methods: animal bait traps, manual capture and community surveillance. We determined the natural infection of *Trypanosoma cruzi* by direct examination and PCR. Line susceptibility was established to fenitrothion and lambda-cyhalothrin by topical application on strains (susceptible and field) in first instar nymphs. We found the LD₅₀ and LD₉₉ using the software POLO-PLUS, Probit and Logit Analysis Version 2.0. We found the resistance degree: LD₅₀ strain field / LD₅₀ laboratory strain.

The effectiveness of the methods of capture was, 5, 16, 78%; for manual capture, light traps and community surveillance, respectively. The sensitivity for *T. cruzi* by PCR and direct examination was 44.4% and 33%. The LD₅₀ and LD₉₉ in laboratory and field strains, in nanograms / insect, were: 1,194, 5,764 and 0,024, 0,131 for lambda-cyhalothrin and 1,476, 7,354 and 0,482, 5,471 to fenitrothion, respectively. The resistance degrees were: GR = 48.9 to lambda-cyhalothrin and GR = 3.06 to fenitrothion.

Community surveillance is the most effective method for determining the presence of the vector in domiciles and peridomiciles. Natural infection was established for *T. cruzi* by PCR and direct examination. Lambda-cyhalothrin recorded greater insecticide potential than fenitrothion in the strains tested. Field strain shows resistance to lambda-cyhalothrin and fenitrothion, influenced by the use of chemicals in the area. Implement measures to early detection of resistance in triatomines is important in the design of vector control programs.

*Mastery thesis

**Health Faculty, Medicine School, Basic Sciences Department, Biomedical Basic Sciences Mastery, Director: Víctor Manuel Ángulo Silva Med. M.Sc

INTRODUCCIÓN

El mal de Chagas es una enfermedad grave, en ocasiones mortal, causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. Sus primeros síntomas son fiebre, fatiga, inflamación de los ganglios y dolor cardíaco, pero con el paso de los años la infección puede provocar una debilitación crónica resultante de la destrucción del músculo cardíaco (Lugones, 2002; Rassi et al., 2010). Se registra principalmente en América Latina, donde se estima que durante el decenio de 1980 estaban infectadas más de 20 millones de personas (WHO 2002). Desde entonces, los países de esa zona han realizado enormes esfuerzos para controlar la transmisión de la enfermedad y las estimaciones actuales indican que el número de personas infectadas es inferior a 8 millones, sin embargo, la salida de latinoamericanos portadores de la enfermedad procedentes de países endémicos ha ocasionado que este mal no esté solo confinado en esa zona de las Américas; y en efecto, se han detectado casos de transmisión mediante la donación de sangre y de órganos en países no endémicos de Europa, y Norte América (OMS 2007; Rassi et al, 2010; Rassi et al., 2012; Sammartino, 2009).

En Colombia, el estimativo de prevalencia de la infección por *T. cruzi* es de 1.300.000 habitantes y de 3.000.000 de individuos en riesgo de adquirir la infección, de acuerdo con la distribución geográfica de insectos vectores (Guhl et al., 2003). Dadas las características del contexto donde el Chagas existe, el tema supera ampliamente los límites de la realidad biomédica, resulta un problema complejo y profundamente social que requiere aproximaciones de investigación, prevención, control y tratamiento que brinden respuestas integrales, acordes a las características de los escenarios actuales (Briceño y Galván, 2007).

La Organización Mundial de la Salud y el Banco Mundial vienen adelantando investigaciones por cerca de un cuarto de siglo, conducentes al control y eventual eliminación de esta patología en Suramérica. En 1991, los Ministros de Salud de algunos países suramericanos, lanzaron un proyecto multinacional

que se conoce como la Iniciativa del Cono Sur, este programa multinacional viene trabajando mancomunadamente desde 1992 y refleja el compromisorio político de los Gobiernos de estos países para lograr las metas propuestas (Min Salud Buenos Aires 1998). Estas iniciativas se extendieron a los países andinos y luego a los centroamericanos para eliminar la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas (TDR (Tropical Diseases Research), 2002).

Los Ministerios de Salud de los países del cono sur disponen de datos epidemiológicos y entomológicos sobre desinsectación de viviendas rurales, infección por *T. cruzi* en grupos etéreos jóvenes y cobertura de tamizaje en bancos de sangre que indican que la interrupción de la transmisión de la Enfermedad de Chagas se ha logrado en Uruguay (1997), Chile (1999) y Brasil (2000) (WHO, 2002).

En Colombia, el Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas fue concebido con los siguientes componentes: lucha antivectorial, control transfusional (tamizaje obligatorio de los donantes se inició en 1995), control de la transmisión congénita, tratamiento de los pacientes infectados y mejoramiento de las viviendas rurales (Giraldo et al., 2008). Desde 1996 se creó el Programa Nacional del Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas (Guhly Vallejo, 1999); en su marco se han iniciado actividades de aspersion de insecticidas piretroides y organofosforados y políticas de mejoramiento de vivienda en Boyacá, Casanare, Santander, Norte de Santander y Arauca (Guhly Vallejo, 1999; Angulo y Sandoval, 2001). Dichos departamentos forman parte de las zonas catalogadas como de alto y mediano riesgo de infección, donde el uso de insecticidas se ha hecho extensivo como medida de control (Sánchez, 2005).

En Santander y otros departamentos de alto riesgo, se han registrado las principales especies de triatomíneos domiciliados en Colombia, como son *Rhodnius prolixus* (municipios de Simacota, Güepsa, Ocamonte, Pinchote, San Joaquín, Málaga, Chárala y Bucaramanga), *Triatoma dimidiata* (municipios de Contratación, Curití, El Carmen, Málaga entre otros) y *Triatoma venosa*

(Contratación, el Carmen, San Gil, San Joaquín, Málaga, Socorro y Suaita (Guhl, 1999; WHO, 2002). Otras especies distribuidas en el departamento y que se han incluido en ciclos silvestres (Guhl, 1999) son *R.pallescens*, encontrada en San Vicente, San Gil, Contratación, El Carmen, y Socorro; *P.humeralis* y *P. rufotuberculatus*, encontrados en el Carmen, San Vicente de Chucurí y *P. geniculatus* hallado en Barichara, Contratación, Curití, El Carmen y Pinchote (Molina et al., 2000).

Al implementar un Plan de Control Nacional para determinar la situación epidemiológica y el riesgo de transmisión en zonas de alto riesgo como la región Nor-Oriental del país (Norte de Santander, Arauca, Santander), se tienen en cuenta los siguientes factores: tipificación del domicilio y peridomicilio como factor de riesgo para la domiciliación de triatominos, la prevalencia de la infestación domiciliaria, la distribución de especies de triatominos domiciliarios y el índice de infección con *T. cruzi* (Angulo, 1999). Para esto, se requiere la integración de la vigilancia entomológica con la vigilancia epidemiológica.

La vigilancia entomológica está referenciada en la búsqueda y erradicación del vector. El control químico ha controlado el vector hasta eliminarlo y ha permitido obtener mejores resultados que otro tipo de controles en la vigilancia de la transmisión de la enfermedad (Zerba, 1987).

El control de vectores se ha dificultado en algunos países debido a la aparición de resistencia a insecticidas. El uso intensivo e indiscriminado de plaguicidas ha contribuido al desarrollo de resistencia a nivel genético. En el tiempo se ha incrementado el número de artrópodos resistentes, de importancia en salud pública, y casos de resistencia múltiple han aparecido en algunas especies. (Alzogaray, 2003; Chavasse y Yap, 1997; Picollo et al., 2005). La principal defensa contra la resistencia está enmarcada en la vigilancia de la susceptibilidad en las poblaciones vectores. De allí que implementar medidas para detección temprana de la resistencia en triatominos es importante en el diseño de programas de control de vectores, por cuanto facilita la selección del insecticida apropiado o la inclusión de otros métodos complementarios (WHO, 1992; Vassena y Picollo, 2003).

La resistencia de triatominos a insecticidas ha sido reportada a nivel de campo en ciertas áreas de Venezuela: en cepas de *Rhodnius prolixus* con carbamatos y organofosforados (González-Valdivieso et al., 1971) y con piretroides (Soto y Molina, 2001; Vassena et al., 2000) y de *T. infestans* en Argentina (Vassena y Picollo, 2003). El uso continuo de insecticidas para controlar las poblaciones de triatominos ha constituido una fuerte presión selectiva que condujo a la aparición de focos de insectos resistentes, conllevando al fracaso de las medidas de control en algunos países del cono sur (Alzogaray, 2003). Esta situación es preocupante ya que la resistencia de los triatominos al control de tipo químico dificulta la eliminación del vector y por tanto aumenta la posibilidad de transmisión de la enfermedad de Chagas.

En los últimos años se ha venido observando la visita ocasional a viviendas rurales, cabeceras municipales y viviendas urbanas de algunas especies de triatominos entre las cuales se destaca *P. geniculatus* (Angulo, 2000) y además existen reportes de domiciliación de esta especie en Colombia y Venezuela (Milva et al., 2012; Reyes, 2010; Reyes, 2009; Vera et al., 1998; Wolf y Castillo, 2000).

La importancia de esta especie radica en su posible implicación en la presencia de casos agudos de la enfermedad de Chagas en zonas donde no hay presencia de triatominos domiciliados. Algunos de estos brotes fueron los ocurridos en la zona rural del municipio de Lebrija en el 2008, en donde murió un paciente de 23 años, hubo además dos casos confirmados de contagio de esta enfermedad. Luego de encuestas epidemiológicas en la misma zona, se confirmaron diez casos más de contagio (Zambrano et al., 2010). En 2009 se registró el caso fatal de una niña de un año y se confirmaron otros cinco casos en familiares de la paciente. Otro caso de brote de Chagas agudo se presentó en los municipios de Piedecuesta y Girón en el 2009, en donde un niño de seis años fue hospitalizado en la Fundación Cardiovascular por sintomatología típica chagásica (fiebre, vómito, edema facial, distensión abdominal), se le diagnosticó miocarditis y se confirmó el contagio de la enfermedad con prueba diagnóstica por Elisa positivo, cuatro familiares del niño también fueron

afectados. Vale la pena resaltar que en todos los casos, la búsqueda activa de vectores dio como resultado el hallazgo de *P. geniculatus* y *R. pallescens*, naturalmente infectados con *Trypanosoma* sp. (Zambrano et al., 2010).

P. geniculatus posee la distribución geográfica más amplia en América: abarca dieciocho países y se ubica desde 0 a los 2000 m de altitud (Curto de Casas, 1996). En Colombia, *P. geniculatus* se ha reportado en veinticinco departamentos (Guhl et al., 2007). En Santander; *P. geniculatus* ha sido encontrado en cuarenta municipios, distribuido en 125 veredas y doce cascos urbanos. En el área metropolitana de Bucaramanga se ha encontrado este triatomino en los barrios: Bucaramanga, Terrazas, Porvenir, Ciudadela Real de Minas, Mutis, Sotomayor, Ciudad Venecia, Chorreras de San Juan, Campo hermoso, San Alonso, Altos de Caracolí, Altos Campestre, Versalles (Floridablanca) y Refugio (Piedecuesta) (Zambrano, 2010) y Villa del prado (Comunicación personal Grupo CINTROP). Este evento es preocupante ya que es inminente la entrada de este insecto al ciclo doméstico, lo que favorece la transmisión de esta enfermedad a las poblaciones humanas. Se necesita encontrar estrategias que contrarresten dicha acción.

Teniendo en cuenta que en Colombia la principal estrategia para el control integrado de la infestación es el uso de sustancias químicas insecticidas de acción residual (Giraldo, 2008); es fundamental realizar monitoreo de la susceptibilidad a insecticidas de especies silvestres que están incursionando al domicilio humano, con el propósito de monitorear su efectividad y detectar prematuramente cepas resistentes. Dentro de las actividades de detección de resistencia es de suma importancia el desarrollo de metodologías estandarizadas a fin de garantizar la comparación de resultados.

En este trabajo se propone la evaluación de la resistencia a insecticidas en cepas de campo de *P. geniculatus* a través de la extensión del protocolo de evaluación de la actividad insecticida en triatominos y monitoreo de la resistencia aprobado por la OMS (1994); lo cual brindará información para elegir alternativas de control. El trabajo también permitirá el establecimiento de las líneas base de susceptibilidad por primera vez para esta especie en el país.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Colonizar, determinar la infección natural por *T. cruzi* y analizar la susceptibilidad a los principios activos lambdacihalotrina y fenitrotión en una cepa de laboratorio y una población de campo de *P. geniculatus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la tasa de captura de diferentes métodos de colecta utilizados para la obtención de una población de campo de *P. geniculatus*.
- Determinar la tasa de eclosión en diferentes sustratos de ninfas 1 en una población de campo de *P. geniculatus*.
- Determinar la infección natural por *Trypanosoma cruzi* en la población de campo de *P. geniculatus* mediante examen directo y PCR de ADN nuclear satelital.
- Establecer la línea base de susceptibilidad de lambdacihalotrina y fenitrotion en ninfas de primer estadio en una cepa de laboratorio de *P. geniculatus*.
- Determinar cuantitativamente si hay resistencia a los principios activos de insecticidas en ninfas de primer estadio de una población de campo de *P. geniculatus*

3. MARCO TEORICO

3.1 La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana se puede definir como una enfermedad parasitaria crónica, causada por un protozoo flagelado, el *T. cruzi* (Rassi et al., 2010). Su contagio se presenta por transmisión vectorial a través de las deyecciones de insectos hemípteros hematófagos, pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Comúnmente son llamados pitos, chinches besucones o chiribicos en Colombia, vinchucas en Chile y Argentina, chipos en Venezuela, barbeiros en Brasil (Guhl 2007; Sanmartino, 2009). Otras formas de transmisión son la congénita, transfusión sanguínea, trasplante de órganos, accidental y por consumo de alimentos contaminados (Chagas oral) (OPS, 2009; Zambrano, 2010). Debe su nombre a Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileño que la descubrió en 1909, describiendo su agente causal, reservorios, insectos vectores y su sintomatología. Se estima que más de 7 millones de personas se encuentran infectadas y que más de 100 millones están expuestas a contraer la infección (Coura, 2007; Sanmartino, 2009).

3.1.1 Síntomas

Respecto a la evolución de la enfermedad, se observa que después de 10 días de incubación, la persona entra en una fase aguda que puede ser asintomática, en ésta, se presentan síntomas inespecíficos o se puede dar como un cuadro clínico severo, más frecuente en personas jóvenes. En esta fase, los parásitos, se pueden encontrar en sangre y se evidencia por síntomas como fiebre, cefalea, anorexia, malestar, mialgia, debilidad, náuseas, vómitos, diarrea, hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía local o generalizada (Toso et al., 2011). Luego de un período que dura aproximadamente 2 ó 3 meses,

comienza una fase también asintomática donde dan positivos los análisis de laboratorio, pero aparentemente no se desarrolla ninguna alteración orgánica atribuible al Chagas. Se calcula que el 75% de las personas infectadas permanecerá en esta fase durante toda su vida, el 25% restante evolucionará hacia una etapa crónica luego de 15 a 20 años, y desarrollará lesiones de diversa complejidad principalmente en el corazón, pero también en el tracto digestivo o el sistema nervioso (Storino et al., 2003; Coura, 2007), tales manifestaciones pueden ser cardiopatías, megamalformaciones o ambos. Lo más común es la presencia de miocarditis asociadas a arritmias y cardiomiopatías dilatadas. A su vez, pacientes con anormalidades digestivas pueden presentar cuadros clínicos de megaesófago y megacolon (Toso et al., 2011).

Se estima que en la década de los 80's, esta enfermedad afectó aproximadamente a una población de 16 a 18 millones de personas y más de 100 millones estaban en riesgo de infección en 21 países de América Latina (WHO, 2004). Según lo relatado por Rassi en el 2012, la Organización Panamericana de Salud (PAHO), registró que para el año 2005, 109 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad y 7,7 millones se encontraban infectados, poniéndolas en riesgo de desarrollar complicaciones cardíacas y gastrointestinales (Rassi et al., 2012; Rassi et al., 2010). Estas cifras reflejan el alto riesgo de adquirir esta parasitosis y por tanto, constituye uno de los problemas de salud pública más graves de América Latina y una de las endemias más expandidas del continente Americano (OMS, 2007).

3.1.2 Formas de transmisión

Las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas son las siguientes:

a. Transmisión Vectorial: es la principal vía de transmisión, en el 80% de los casos, la enfermedad en los humanos se debe a la transmisión vectorial, a través de las heces del *Triatoma*. Esta se da cuando a través de las heces del

insecto penetran los parásitos por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz (Zambrano, 2010; Rassi 2010; WHO 2002).

Hay descritas más de 130 especies de triatominos (Costa y Lorenzo, 2009), de las cuales más de la mitad se infectan en forma natural o experimentalmente con el *T. cruzi* (Schofield, 1994). Sin embargo, las especies más importantes desde el punto de vista epidemiológico, son aquellas que colonizan las viviendas humanas, generalmente confinadas a los ambientes domésticos y peridomésticos de las zonas rurales, semirurales y periurbanas de vastas regiones de Latinoamérica. En Colombia, las especies consideradas domiciliarias son *R. prolixus* (Stål 1859), *T. dimidiata* (Latreille 1811) y *T. maculata* (Erichson 1848); especies como *T. venosa* (Stål 1859), *P. geniculatus* (Latreille 1811) y *R. pallescens* (Barber 1932), son considerados vectores secundarios pero han empezado a incrementar su importancia epidemiológica debido a su intrusión al ambiente doméstico (Guhl, 1999; Molina, 2000; Vallejo et al., 2009).

b. Vía Trasplacentaria, la infección prenatal por vía trasplacentaria de *T. cruzi* en la circulación materna con infección aguda o crónica, es posible, pero no obligada. El riesgo de transmisión congénita parece variar en función de diferentes factores epidemiológicos, tales como la cepa del parásito, laparasitemia de la madre, la existencia de lesiones en la placenta, y la región geográfica (WHO 2002). Estimaciones recientes calculan que al año ocurren 1000 nuevos casos de Chagas congénito en nuestro país (OPS, 2006). Según lo descrito por Cucunubá en el 2011, en Colombia se calcula que la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres gestantes de municipios endémicos es del 3.97% y la transmisión transplacentaria es del 20% en hijos de madres infectadas. La enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas es un hecho relevante en zonas rurales y urbanas de Colombia, pero problemas en los servicios de salud ha impedido el diagnóstico, el tratamiento y el control de la enfermedad en las mujeres y recién nacidos. Se requieren normas a nivel

nacional que permitan la cobertura de los servicios de salud para las madres, los recién nacidos y sus familiares (Cucunubá et al., 2012).

c. Por leche materna, la posibilidad de infección del hijo por la leche de madre que padece enfermedad de Chagas es posible, ha sido verificada clínicamente y cuenta con ratificación experimental, su ocurrencia es excepcional y muchos especialistas consideran que es un riesgo importante (WHO 2002).

d. Por hemotransfusión, otro considerable número de infecciones se produce mediante la transfusión de sangre proveniente de donadores con infecciones ignoradas, generando cuadros clínicos agudos en los receptores, se han registrado casos mortales (WHO, 2002; Guhl, 2007).

e. Por contaminación accidental en laboratorio, son múltiples los casos conocidos de esta enfermedad por infección accidental en laboratorios médicos, por manipulación de chinches provenientes de animales infectados, cultivos de *T. cruzi* o material biológico proveniente de personas infectadas, en línea: (WHO, 2002; Guhl, 2007).

f. Por ingestión de alimentos altamente contaminados, como la carne poco cocida de mamíferos silvestres. Según lo narrado por Toso y colaboradores 2011, este tipo de transmisión, está tomando gran importancia en la actualidad, su presentación clínica es diferente a la observada en las formas tradicionales de la infección. Luego de 5 días post-ingesta contaminada, se da una manifestación aguda que resulta en miocarditis grave. El cuadro clínico es de alta mortalidad, y su pronóstico empeora cuando la edad del paciente es menor (Barbosa, 2012; Guhl, 2007; Zambrano, 2010).

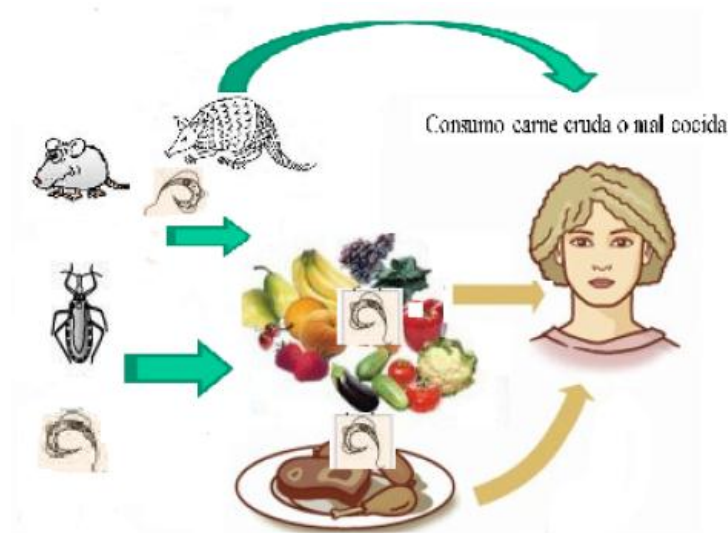
En la transmisión oral se presentan factores de riesgo de tipo inmediato (consumo de alimentos “in natura”) o mediato (a través de la contaminación de alimentos desde su origen, por su almacenamiento, por el transporte

inadecuado o en su preparación) (Guhl, 2007; Zambrano, 2010). La Figura 1 muestra la presencia del parásito en este tipo de transmisión.

De esta forma y según lo citado por Zambrano, la transmisión oral de esta enfermedad se puede dar por:

- a. La ingesta de los insectos infectados, ya que pueden ser procesados junto con los alimentos (ejemplo; lo ocurrido con el jugo de “acãï”) (Benchimol, 2006).

Figura1.Contaminación con heces y orina de reservorios y/o triatominos infectados. Transmisión Oral de la enfermedad de Chagas a humanos.



Fuente: Zambrano 2010.

- b. Por heces de triatominos (en la preparación o consumo de los alimentos).
- c. Por la alimentación, sin suficiente cocción de la carne y sangre de animales que estén infectados, (sangre de armadillos, faras).
- d. A través del consumo de alimentos contaminados con la secreción de reservorios (OMS, 2009).

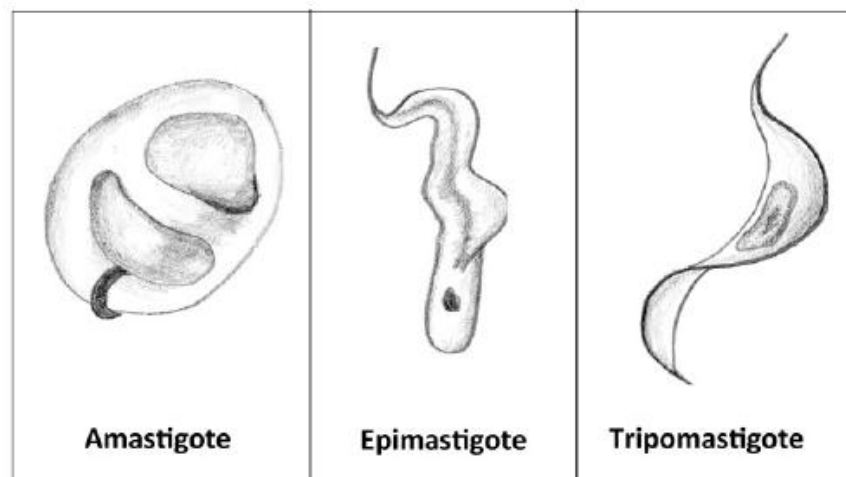
3.2 *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* es un parásito protozoario causante de la enfermedad de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas (Rassi et al., 2010).

3.2.1 Formas celulares y ciclo de vida de *T. cruzi*

Dependiendo del hospedero en que se encuentre, el *T. cruzi* toma diferentes formas celulares (Figura 2) entre las cuales están el epimastigote, que es la forma extracelular y replicativa presente en el intestino de los triatominos; el tripomastigote, es la forma celular no replicativa e infectiva y se encuentra en la sangre de los mamíferos, en el intestino posterior de los vectores y en sus deyecciones, estos entran por el lugar de la picadura o por erupciones de la piel; finalmente están los amastigotes que son las formas intracelulares replicativas hallados en las células de los mamíferos (Toso et al., 2011).

Figura 2. Formas intracelulares de *T. cruzi*

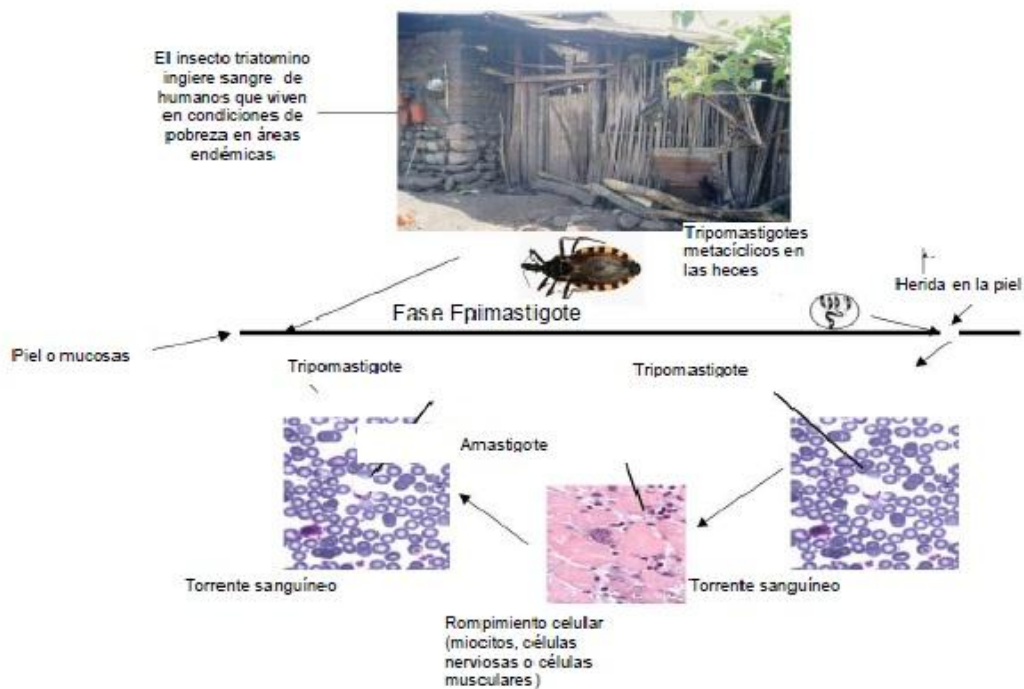


Fuente: Toso et al., 2011

Como lo descrito por Toso y colaboradores en el 2011, cuando un triatomino portador del parásito se alimenta de un mamífero, ingiere sangre y simultáneamente defeca. En las deyecciones se encuentran las formas tripomastigotas que ingresan por el lugar de la picadura o por erosiones de la

piel y son fagocitados, fundamentalmente por macrófagos. En la célula hospedera, el tripomastigote es incorporado en una vesícula parasitófora, de la que escapa alojándose en el citoplasma, donde se diferencia en amastigote. Esta forma celular inicia numerosos ciclos de división, ocupando el citoplasma de la célula hospedera. Posteriormente los amastigotes se diferencian a tripomastigotes altamente móviles, que son liberados al torrente sanguíneo desde donde infectan otras células blanco como por ejemplo células ganglionares o musculares. Estos tripomastigotes sanguíneos, al ser ingeridos por triatominos, se diferencian en el intestino anterior a epimastigotes que se dividen y migran hacia el intestino posterior del insecto. Cuando alcanzan el recto se adhieren a la pared por su flagelo y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Una vez que se despegan de la pared intestinal, son eliminados por las heces del insecto completando el ciclo de vida (Toso et al., 2011). El vector se vuelve infectante a los 30 o 40 días de después de haber ingerido sangre infectada. La infección del triatomo persiste durante toda su vida (Guhl, 2007). La Figura 3 muestra el ciclo de vida de *T. cruzi* (ciclo de replicación y transmisión del parásito).

Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*



Fuente: Paredes et al., 2009

3.2.2 Ciclos de transmisión de *T. cruzi*

Hay tres ciclos de transmisión en los que interviene el vector:

Ciclo doméstico

Se presenta en viviendas rurales o urbanas. Los principales reservorios del parásito son los seres humanos, los perros y una gran gama de animales domésticos como gallinas y cerdos entre otros, además de encontrarse en faras (*Didelphis marsupialis*), reservorio importante del parásito. Los vectores se encuentran en las grietas de las paredes, techos y en lugares del peridomicilio como gallineros, pilas de leña y arrumes de piedras (Guhl, 2007).

Ciclo peridoméstico

En este intervienen algunos mamíferos como roedores, marsupiales, perros, que pueden entrar y salir libremente de las viviendas y triatomas silvestres, que son atraídos por las casas por la luz o por fuentes de alimento. Este ciclo es un nexo entre los ciclos domésticos y selváticos (Guhl, 2007).

Ciclo selvático

Se ha descubierto gran cantidad de mamíferos que se pueden infectar naturalmente con *T. cruzi*, al igual que una gran cantidad de vectores selváticos que también se infectan y a su vez infectan roedores, marsupiales y armadillos entre otros. Entre estos vectores están *P. geniculatus*, *Rhodnius pallescens*, y *R. colombiensis* (Guhl, 2007).

3.2.3 Identificación de *T. cruzi* en heces de triatominos

Para la identificación de *T. cruzi* en heces de triatominos se utilizan las siguientes técnicas:

- a. Directo: La extracción de las heces en triatominos capturados en estado adulto se realiza presionando el abdomen del insecto sobre un portaobjeto con una gota de solución salina. Cuando el insecto está muerto, se realiza un lavado de la parte rectal, las muestras preparadas se observan en un

microscopio óptico a 40X para observar la presencia o ausencia de *T. cruzi* (Maizels et al., 1988). Esta técnica evidencia *Trypanosoma* sp.

b. PCR: Como lo descrito por Zulantay y colaboradores en el 2009, una herramienta esencial para el diagnóstico parasitológico de la Enfermedad de Chagas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa, ya que esta presenta una alta sensibilidad, especificidad y rapidez para amplificar diferentes secuencias de *T. cruzi*. (Soto, 1998).

Ferrer y colaboradores (2008) citan los tipos de PCR utilizados para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, entre estos se encuentran la PCR para la detección de ADN de minicírculo de Kinetoplasto de *T. cruzi* y la PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi*.

El ADN de kinetoplasto (ADNk), es una condensación de ADN extra nuclear que constituye entre el 20-30% del ADN total del parásito. Está formado por una red de moléculas circulares: maxicírculos y minicírculos. Cada uno de estos minicírculos presenta cuatro regiones constantes y cuatro variables. Los cebadores diseñados para las PCR se unen a las regiones constantes delimitando las regiones variables, amplificándose estas últimas, esta zona es altamente específica y sensible ya que solo amplifica el ADN de *T. cruzi*.

El ADN nuclear satelital del *T. cruzi*, representa el 10% del ADN del parásito, convirtiéndolo en una diana altamente sensible. Este tipo de PCR, fue diseñada por Moser y colaboradores (1989), quienes a partir de muestras de sangre de ratones y de pacientes, realizaron amplificaciones de ADN repetitivo de 188 pb "in vitro" demostrando la alta especificidad y sensibilidad de esta técnica para *T. cruzi*, además está también se puede utilizar en muestras provenientes de heces de triatomíneos (Ferrer y colaboradores, 2008).

3.3 *Panstrongylus geniculatus*

En la actualidad *P. geniculatus* está recibiendo gran atención como vector de la tripanosomiasis americana dado el número creciente de reportes de esta especie invadiendo el hábitat doméstico y peridoméstico en un área amplia

de Venezuela, Colombia, Brasil, Perú, Ecuador y Argentina. Al parecer *P. geniculatus* está entrando en un proceso de domiciliación (Reyes et al., 2009, Feliciangeli et al., 2004). En Colombia, *P. geniculatus* se ha reportado en 25 departamentos incluyendo a Santander, Norte de Santander, Boyacá, Cundinamarca, Meta, Arauca y Boyacá entre otros (Molina et al., 2000). El caso de domiciliación de *P. geniculatus* es muy interesante epidemiológicamente dado que este proceso está ocurriendo en centros altamente urbanizados, como es el caso de Amalfi, Antioquia (Gualdron et al., 1999) y en Caracas, Venezuela (Carrasco et al., 2005), entre otros (Costa Valente et al., 1998; Costa Valente, 1999; Milva, 2012; Reyes 2009).

3.3.1 Ciclo de vida de *P. geniculatus*

Según lo descrito por Wolff y González (1991), al igual que los demás hemípteros triatominos, *P. geniculatus* es estrictamente hematófago, en todos sus estadios de vida. Algunos datos del ciclo de vida de *P. geniculatus* en condiciones de laboratorio ($T^{\circ}=28-30^{\circ}\text{C}$, humedad relativa= 95%, alimentación con *Mus musculus* por 40 min cada 8 días) son los siguientes:

Huevos: Tienen apariencia redondeada, de aproximadamente 2 mm de largo; en uno de sus extremos se encuentra el opérculo por el que se realiza la eclosión. Los primeros días son de color blanco brillante y después de 6-8 días adquieren una tonalidad perlada que luego se torna rojiza. La eclosión ocurre a los $22,3 \pm 2,9$ días después de la ovipostura.

Ninfas I: Al principio son de color blanquecino y antes de alimentarse miden en promedio 3 mm de largo, luego toman una pigmentación más oscura y unos 3-5 días más tarde están en condiciones de realizar su primera alimentación sanguínea. Duran en promedio $29,8 \pm 2,3$ días.

Ninfas II: Las ninfas en este estadio se diferencian de las del anterior por el tamaño, alcanzando 5-7 mm de largo; en éstas se empiezan a observar los primeros vestigios de conxivo (margen lateral saliente en el abdomen de los

hemípteros), pero su pigmentación sigue siendo muy uniforme. Este estadio dura en promedio $16,3 \pm 2,4$ días.

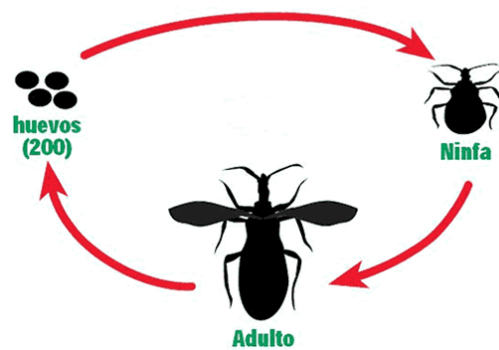
Ninfas III: Estas ninfas son de mayor tamaño, alcanzando 10-12 mm de largo; el conxivo se empieza a diferenciar más claramente; permanecen $25,3 \pm 4,4$ días en este estadio.

Ninfas IV: Miden 14-16 mm de largo; es posible observar los primordios de alas que llegan a los primeros segmentos abdominales; las pigmentaciones de los conxivos se hacen más fuertes al igual que las del tórax. Este estadio dura $35,2 \pm 4,7$ días.

Ninfas V: Las ninfas V son muy similares al estadio anterior en cuanto al desarrollo de alas y del conxivo, diferenciándole básicamente en el tamaño. Alcanzan 18-19 mm de largo. Tardan 27-40 días para llegar a adultos.

Adulto: Se presenta dimorfismo sexual a nivel del extremo posterior del abdomen, terminado en punta en la hembra y romo o redondeada en el macho. La hembra es de mayor tamaño, alcanzado 26-28 mm de largo, mientras que el macho mide 23-24 mm. El tiempo completo de desarrollo fue de 128-171 días. Este tiempo es mucho menor que el que había registrado otros autores (Mayer et al., 1946; Corredor et al., 1990), los cuales informaron de una duración del ciclo de 2 años bajo condiciones de laboratorio en Venezuela. Otros autores informaron acerca de la dificultad de mantener esta especie en laboratorio, debido a sus altos requerimientos, principalmente de humedad, alcanzando su desarrollo completo entre 398 y 683 días, sin lograr su colonización después de la primera generación (Lent y Jurberg, 1969). La figura 4 muestra los tres estadios principales de desarrollo de los triatominos; huevos, ninfas y adultos.

Figura 4. Estadíos de desarrollo en triatominos.



Fuente: <http://www.agroambiente.cl/plagas/vinchuca.php> 2010.

3.3.2 Hábitos de comportamiento

P. geniculatus, es estrictamente hematófago, tanto adultos como ninfas. Es considerada una especie silvestre y habita en cavernas de armadillos, cuevas de murciélagos, nidos de pájaros y hojas de palma (Leng and Wygodzinsky 1979; Corredor et al., 1990).

Se ha observado a *P. geniculatus*, volando por las noches desde sus hábitats naturales (bosques) hacia las viviendas, atraído por la luz de las casas y del alumbrado público para luego introducirse en ellas (Reyes, 2009). Una vez dentro, busca grietas o cuevas debajo del piso de la vivienda, ocupándolos si hay suficiente humedad y ratas o ratones. Se reporta a *P. geniculatus* colonizando el ambiente doméstico, al encontrar huevos, ninfas y adultos cohabitando con la rata sinantrópica (*Rattus rattus*) en una madriguera debajo del piso de cemento de una vivienda del estado de Miranda (a 15 km de Caracas). Además se ha observado cohabitando con otros triatominos como *R. prolixus* (Rodríguez et al., 2007; Feliciangeli et al., 2004).

Existen pocos estudios de esta especie dado el bajo número de individuos capturados y la dificultad de mantenerlos en el laboratorio (Cabello et al., 1998).

3.3.3 Distribución de *P. geniculatus*

La intromisión por parte del hombre a los ambientes naturales de los animales, lo ha colocado en contacto con muchas zoonosis, entre estas la tripanosomiasis americana en la cual se involucra triatominos y algunos mamíferos. En zonas boscosas, *P. geniculatus* se ha encontrado en madrigueras de algunos vertebrados como armadillos (*Dasypus Novemcinctus*), faras (*Didelphis Marsupialis*) y roedores silvestres, bajo troncos, raíces de árboles, rocas, leños caídos y copas de palmeras entre otros; estos lugares garantizan condiciones favorables de humedad y temperatura para este insecto (Reyes, 2009).

El peridomicilio abarca todas las estructuras que no comparten el mismo techo que la vivienda principal (cobertizos, gallineros, corrales) (Cécere et al., 1996). Por tanto, los triatominos encuentran allí condiciones para adaptarse a la presencia y alimentación sobre los humanos y pueden llegar al interior de la vivienda como visitantes esporádicos o para formar colonias permanentes” (Cécere et al., 1996). *P. geniculatus* se encuentra en gallineros, corrales y estructuras alrededor de la vivienda (tablas, ladrillos, piedras). La presencia de triatominos dentro de la vivienda (intradomicilio) explica el ciclo doméstico del vector dentro de esta, se ha detectado a *P. geniculatus* en grietas de las paredes y pisos, cajas y otros sitios.

P. geniculatus es de hábitos eminentemente silvestres, es la de más amplia distribución entre las 13 de su género, distribuyéndose en 18 países de Latinoamérica: México, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Colombia entre otros (Patterson et al., 2009, Rocha et al., 2007). En Colombia se ha reportado en 25 departamentos (Gulh et al., 2007) y se ha evidenciado dentro de los domicilios (Wolff y Castillo, 2000). Su importancia epidemiológica y competencia como vector se ha empezado a sugerir por varios autores debido a sus altas tasas de alimentación con sangre humana y se ha visto implicado con casos fatales de Chagas agudo en algunos países como Venezuela, y con Chagas oral en Venezuela y Colombia (Niño et al., 2009; Patterson et al., 2009; Zambrano, 2010).

3.3.4. Intrusión de *P. geniculatus* a los ambientes urbanos

Durante los últimos 50 años se ha incrementado la frecuente introducción de *P. geniculatus* y el contacto con los habitantes y animales domésticos en algunos países de Sur América como Venezuela, Brasil y Colombia (Costa Valente, 1999; Ferreira et al., 2009; Reyes, 2009; Zambrano, 2010). *P. geniculatus* ha acrecentado sus visitas a los ambientes domiciliarios poniéndose en contacto con las poblaciones humanas (Reyes, 2011). Debido a su ecología y comportamiento *P. geniculatus* se había considerado de hábitats selváticos y de los representantes más primitivos entre los triatominos hematófagos. Algunos autores como Zeledón (1974) han implicado a *P. geniculatus* como el protagonista del mantenimiento del ciclo enzoótico de la enfermedad de Chagas, ya que se le encuentra frecuentemente cohabitando con pequeños mamíferos. Esto convertía a *P. geniculatus* como transmisor secundario de *T. cruzi* a los humanos. Sin embargo, en las últimas décadas algunos investigadores han venido alertando acerca del avance de este insecto al ambiente doméstico (Reyes, 1999), al parecer algunas condiciones socio-ambientales son las responsables de la colonización de los domicilios por este triatomino (Reyes, 2009).

En los últimos años, el crecimiento de las zonas urbanas que limitan con los hábitats silvestres de triatominos transmisores de *T. cruzi* y de sus reservorios naturales así como la invasión de zonas silvestres, ha aumentado el contacto de los pitos con el hombre y animales domésticos y en general con el ambiente domiciliar.

El hecho de que *P. geniculatus* se halla mudado de su ambiente selvático a un ambiente urbano, es probablemente ocasionado por la intervención del hombre a sus lugares naturales. Junto con la desaparición de su hábitat, han desaparecido también sus fuentes naturales de alimento como mamíferos pequeños (roedores, marsupiales) siendo sustituidos a su vez por animales de corral y mascotas. Como lo descrito antes, Reyes y Rodríguez reportan por primera vez a *P. geniculatus* colonizando el ambiente doméstico al encontrar

huevos y ninfas cohabitando en una madriguera de ratas (*Rattus rattus*), (Reyes y Rodríguez, 2000).

En algunas zonas es frecuente observar adultos de *P. geniculatus* provenientes de bosques circundantes alterados por la construcción de viviendas y otras actividades antropogénicas (agricultura, tala o incendios) introducirse volando en el ambiente domiciliario, principalmente durante las noches, atraídos por la luz de las casas, lo cual influye en la entrada de estos insectos a las viviendas (Reyes, 2002; Castro et al., 2010). Este fenómeno se ha observado particularmente iniciando el período lluvioso, entre los meses de marzo a junio, donde estos insectos se alimentan de sangre de humanos, perros, ratas y marsupiales manteniendo de esta forma el ciclo de transmisión de la enfermedad de Chagas (Reyes, 2009). El efecto de la luz emitida por bombillos guarda relación en la introducción de este triatomo al ambiente doméstico, esto se sustentó en ensayos con luz artificial (bombillos amarillos incandescentes y blancos fluorescentes), en donde se observó la visita de *P. geniculatus* cuando la luz está encendida, evento común en zonas urbanas durante la noche. Estos y otros datos evidencian que en los últimos años *P. geniculatus* ha contribuido con la transmisión de *T. cruzi* en ambientes domiciliarios (Costa, 1998; Costa, 1999; Milva et al., 2012).

3.3.5 *P. geniculatus* y Chagas oral

La transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral en animales silvestres a través de la ingesta de deyecciones de triatominos se ha registrado desde décadas atrás y más adelante se comprobó que este mecanismo de transmisión podía involucrar a los seres humanos. Según lo citado por Toso en el 2011, se ha considerado la transmisión de *T. cruzi* por vía oral como parte de su ciclo enzoótico, que se continua por la ingesta en mamíferos, de los vectores infectados con el parásito o con sus deyecciones o de reservorios infectados (Shenone et al., 1982). En lugares como la Amazonía se consideró la vía más importante de transmisión entre los años 1968 al 2000.

Algunos casos registrados son los ocurridos en Teutonia, Brasil en donde en 1965 se reportó la infección aguda por Chagas de forma simultánea en 17

pacientes presuntamente por el consumo de vegetales contaminados con secreciones de marsupiales infectados. En 1986, se presentó un hecho similar en Catolé do Rocha, Brasil donde se infectaron simultáneamente con Chagas 26 personas, esto no se pudo explicar por transmisión vectorial y se sospechó transmisión oral al tomar jugo de caña contaminado con heces de triatominos. Nuevamente en 1986 reaparece un nuevo brote por Chagas agudo en 15 casos en el municipio de Mazagão, Amapá, Brasil (Silveira, 2006).

En el 2005 en el estado de Santa Catarina en el sur del Brasil, una zona no endémica se presentaron 24 casos de Chagas agudo asociados con el consumo de jugo de caña contaminado (Valente et al., 2006; Steindel et al., 2008). Se llegó a la conclusión de que la posible forma de transmisión en estos brotes, es oral, ya que se presentaron en zonas no endémicas donde la transmisión es poco probable. En lugares endémicos de la Amazonía, se reportaron varios casos que se relacionaron con el consumo de jugo de açai. Se presume que este fruto habría sido transportado junto con triatominos y triturados en una máquina para preparar dicho jugo. En el 2006 se reportó la transmisión de Chagas oral en el norte y noreste de Brasil, con 6 casos fatales, nuevamente por consumo de açai. En el 2007 y en la misma región se reportaron 88 casos similares. Según lo descrito por Toso en el 2011, en Venezuela, en el año 2007 se presentó un brote en un colegio de la localidad Chichiriviche, donde se confirmó el caso por enfermedad de Chagas. Se trató de 47 estudiantes y 3 profesores contagiados por consumo de jugo de guayaba contaminado, se presentaron 3 casos fatales (Pereira, 2009), para esa misma fecha se presentaron 128 casos, uno de ellos fatal, por consumo de jugo de frutas en un colegio de Chacao (International society for infectious diseases 2009). En el 2009 se presentó la misma situación en el estado de Vargas con un reporte de 80 casos, probablemente por consumo de jugo de guayaba, cuatro de los casos fueron fatales (C.A. Editora El Nacional, Venezuela, 2009).

En Colombia durante el año 2009, se registraron tres brotes de la enfermedad de Chagas aguda, probablemente asociados a transmisión oral. El primero ocurrió en Tibú, Norte de Santander, donde 6 soldados que habían estado antes en regiones selváticas presentaron miocarditis chagásica, y no se

observó signos de puerta de entrada en estos, aunque luego de un estudio no se logró comprobar la transmisión por Chagas oral (Nicholls, 2006). Otro brote se registró en 1999 en Guamal, Magdalena con 22 casos sospechosos, en donde uno solo fue verificado mediante muestra de miocardio. Hubo 5 fallecidos que presentaron sintomatología de síndrome febril prolongado, este brote se asoció con el consumo de vino de palma contaminado pues se encontró en las zonas de extracción de esta bebida, triatominos infectados con *T. cruzi* (Cáceres et al., 1999).

En Santander, durante los años 2008 y 2009, se han reportado 20 casos de pacientes afectados en municipios como Bucaramanga, Lebrija y Girón-Piedecuesta. En Bucaramanga y su área metropolitana, se ha registrado la presencia de *P. geniculatus* en los barrios Bucaramanga, Terrazas, Porvenir, Ciudadela Real de Minas, Mutis, Sotomayor, Ciudad Venecia, Chorreras de San Juan, Campo hermoso, San Alonso, Altos de Caracolí, Altos Campestre, Villa del Prado (Comunicación personal Grupo CINTROP), Versalles (Floridablanca) y el Refugio (Piedecuesta) (Zambrano, 2010). Algunos casos de brotes de Chagas Agudo en esta zona son los siguientes: en el 2008 en la ciudad de Bucaramanga se registró nueve casos de transmisión de Chagas por vía oral, con dos casos fatales. Luego de un mes se reportó en esta misma región una niña que se habría contagiado con la enfermedad de Chagas falleciendo posteriormente (Zambrano, 2010). Otro caso reportado ocurrió en Lebrija, área metropolitana de la ciudad de Bucaramanga, en donde una persona falleció y luego de los análisis respectivos, se observó la presencia de pseudoquistes de tripanosomas intracelulares en el músculo cardíaco, simultáneamente, dos de sus compañeros mostraron un cuadro típico de enfermedad chagásica corroborado a través de pruebas serológicas, el estudio entomológico confirmó la presencia de triatominos silvestres como *P. geniculatus* y *R. pallescens* en lugares de la zona, uno de los cuales estaba infectado con *T. cruzi*. En el municipio de Piedecuesta, se registró un caso de Chagas agudo en niño de 6 años procedente de la zona urbana de Girón. Se realizó seguimiento de los contactos del paciente y se determinó por pruebas serológicas que cuatro de ellos estaban afectados, luego del estudio

entomológico, los habitantes de los dos lugares (Piedecuesta y Girón) capturaron *P. geniculatus* y *R. pallescens* en ambos sitios y se determinó la infección por *Trypanosoma* sp. Sin embargo no se pudo establecer el sitio probable de la infección (Zambrano, 2010).

Vale la pena resaltar que los casos de Chagas oral registrados en Santander, estuvieron relacionados con la presencia de *P. geniculatus*, lo que muy probablemente lo asocia a este tipo de transmisión, ya sea por contaminación de alimentos con secreciones de estos insectos u otras formas de contacto con el hombre.

3.4 Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Algunas drogas como nirfutimox y benznidazol controlan la parasitemia si se aplicandurante los primeros días de la infección (WHO, 2002), además son efectivas para tratar los síntomas en la fase aguda, pero a medida que pasa el tiempo, la eliminación del parásito se hace poco probable, los efectos secundarios de estas drogas son frecuentes y peligrosos y para los casos crónicos no se conocen aun tratamientos ni tampoco una vacuna (Zulantay, 2011). Por esta razón, se busca estrategias de prevención, ya que se considera es la mejor manera de disminuir la incidencia de la enfermedad. Como lo descrito por Felipe Guhl (Guhl, 1999).

3.5 Control de la transmisión de la enfermedad de Chagas

Los métodos de control que satisfagan las necesidades locales relacionadas a la eficacia, economía y aceptación social deben estructurar la base de una estrategia de control, la cual debe ser flexible para poder responder de la mejor forma a las nuevas metodologías y a la fluctuante realidad económica. Para esto se tiene en cuenta una combinación de tres factores: el mejoramiento de las viviendas en las zonas rurales (control físico), la educación sanitaria de la comunidad (control cultural) y el control químico de los insectos vectores (Alzogaray, 2003, Angulo et al., 2011). En 1996 se creó en Colombia el Programa Nacional de Control Vectorial de la enfermedad de Chagas, en

donde se iniciaron actividades de aspersión de insecticidas piretroides y organofosforados implementándose también políticas de mejoramiento de vivienda en departamentos como Boyacá, Casanare, Santander, Norte de Santander y Arauca (Angulo y Sandoval, 2001), respondiendo así a medidas de control.

Vale la pena resaltar la importancia de la vigilancia médica para el control de la transmisión por vía transfusional, que implemente la vigilancia serológica en el 100% de los bancos de sangre, centros de trasplante y hemodiálisis en Colombia (Guhl, 1999).

3.5.1 Control Físico:

A través de este control se busca que las casas no provean condiciones favorables para la colonización del vector tanto por dentro como por fuera de las viviendas. En Santander se ha llevado a cabo estrategias de mejoramiento de vivienda con ayuda del programa “VIVIR MEJOR” de la Red Solidaria y la Caja Agraria, en donde se logró focalizar recursos para las zonas con más infestación y menor calidad de vivienda, ya que en la medida en que las condiciones de vivienda desmejoran, la probabilidad de riesgo de infestación crece. Este programa de control se relacionó a su vez con el programa de vivienda rural cuyo lema fue “Vivienda sana, Salud para la familia” en respuesta a un mejoramiento integral de las viviendas (Angulo, 1999). El mejoramiento del peridomicilio reduce la posibilidad de colonización de especies que prefieren ecotopos al aire libre asociados a animales domésticos. Se ha observado que en zonas rurales, la estructura de la casa la hace vulnerable a la infestación de los triatominos. Las paredes de barro, yeso, grietas y techos de paja ofrecen escondites, además, existe una estrecha relación entre los seres humanos y los animales domésticos que son fuente disponible de sangre para estos insectos (Campbell et al., 2007). Por tanto, la interrupción de la transmisión por triatominos se logra principalmente mediante campañas de fumigación con insecticidas, con el mejoramiento de estructuras y con la limpieza en el interior de las viviendas (Giraldo et al., 2008; WHO, 2002).

3.5.2 Control Cultural

Para mantener la vivienda libre de triatominos se hace necesario educar para la salud y la participación comunitaria. Dichas medidas encierran un proceso dinámico de educación que proporcionan información sobre la enfermedad, sus formas de transmisión, medidas de prevención (mantenimiento de la casa para evitar reinfestaciones por estos insectos) y la información a las autoridades competentes en caso de registrar la presencia de estos triatominos. La búsqueda activa de estos insectos se hace necesaria para la vigilancia constante del vector. La comunicación y la educación tiene un papel esencial en el control y vigilancia de triatominos vectores (Angulo, 1999; WHO, 2002).

3.5.3 Control Químico

El control de la enfermedad de Chagas en Colombia se viene realizando mediante el uso de insecticidas. Siguiendo la tendencia mundial, el control de los vectores de Chagas derivó al uso de fosforados. Estos insecticidas inhiben la colinesterasa, enzima que degrada el neurotransmisor acetilcolina y es indispensable para el desarrollo normal de la actividad nerviosa (Stenersen, 2004). A pesar de esto, los organofosforados han sido muy cuestionados a causa de su toxicidad en mamíferos. Por esto se buscan alternativas más seguras (Alzogaray 2003). Últimamente, como alternativa de control químico contra los triatominos se está utilizando piretroides, los cuales son moléculas con actividad insecticida que se aplican a cosechas y plantas de jardines para el control de plagas. Los piretroides son sustancias químicas que generalmente son más tóxicas para los insectos que para los mamíferos, permanecen durante más tiempo en el medio ambiente ya que sus propiedades químicas los hacen más estables a la luz solar y el calor (Neumann y Peter 1987). Los piretroides son análogos sintéticos de las piretrinas producidas por el crisantemo *Chrysanthemum cinerariifolium* (familia Asteraceae). Su sitio de acción primario son los canales de sodio dependientes de voltaje de las membranas neuronales (Ruigt 1985). Los piretroides mantienen estos canales

en estado abierto, prolongando la corriente de sodio que ingresa a las neuronas. El primer síntoma visible de intoxicación en los insectos tratados con piretroides, es un aumento de la actividad locomotora (Benoit et al. 1985, Alzogaray et al. 1997). Son sustancias altamente eficientes siendo necesarias menores cantidades del producto activo, al compararlo con carbamatos y fosforados, resultando en menor contaminación y menor riesgo para los seres humanos (Sucen 2010).

En 1978 se realizó en Argentina la primera evaluación de la toxicidad de un piretroide en *Triatoma infestans* (Zerba et al. 1997). Éste y otros estudios demostraron que los piretroides eran herramientas potenciales y prometedoras para el control de los vectores de Chagas (Casabe et al. 1988). Dentro de estos insecticidas, se destacan los principios activos deltametrina y lambda-cihalotrina debido a su intenso y rápido efecto insecticida. Por otra parte, algunas experiencias en la utilización de piretroides en zonas infestadas con triatominos han demostrado falta de eficacia en el control de éstos, muy probablemente por diferencias en la susceptibilidad y posible resistencia incipiente en las poblaciones de campo (Vassena y Picollo 2003). El uso continuo de piretroides para controlar las poblaciones de *T. infestans* ha constituido una fuerte presión selectiva que condujo a la aparición de focos de insectos resistentes a estos insecticidas. Desde 1995, con el apoyo de las autoridades sanitarias (Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación) y la colaboración de los Jefes de los Programas Provinciales, el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) realizó la evaluación en condiciones de laboratorio de la respuesta a los insecticidas en insectos recolectados en distintas provincias argentinas (Zerba 1999). Esta vigilancia permitió detectar focos de resistencia incipiente a piretroides en muestras de *T. infestans* recolectadas en varias provincias argentinas y en Brasil, en muestras de *R. prolixus* provenientes de Venezuela y durante ensayos de laboratorio con ninfas de primer y quinto estadio de *Triatoma dimidiata* en Santander, Colombia (Reyes Jerez et al. 2007).

3.6 Insecticidas

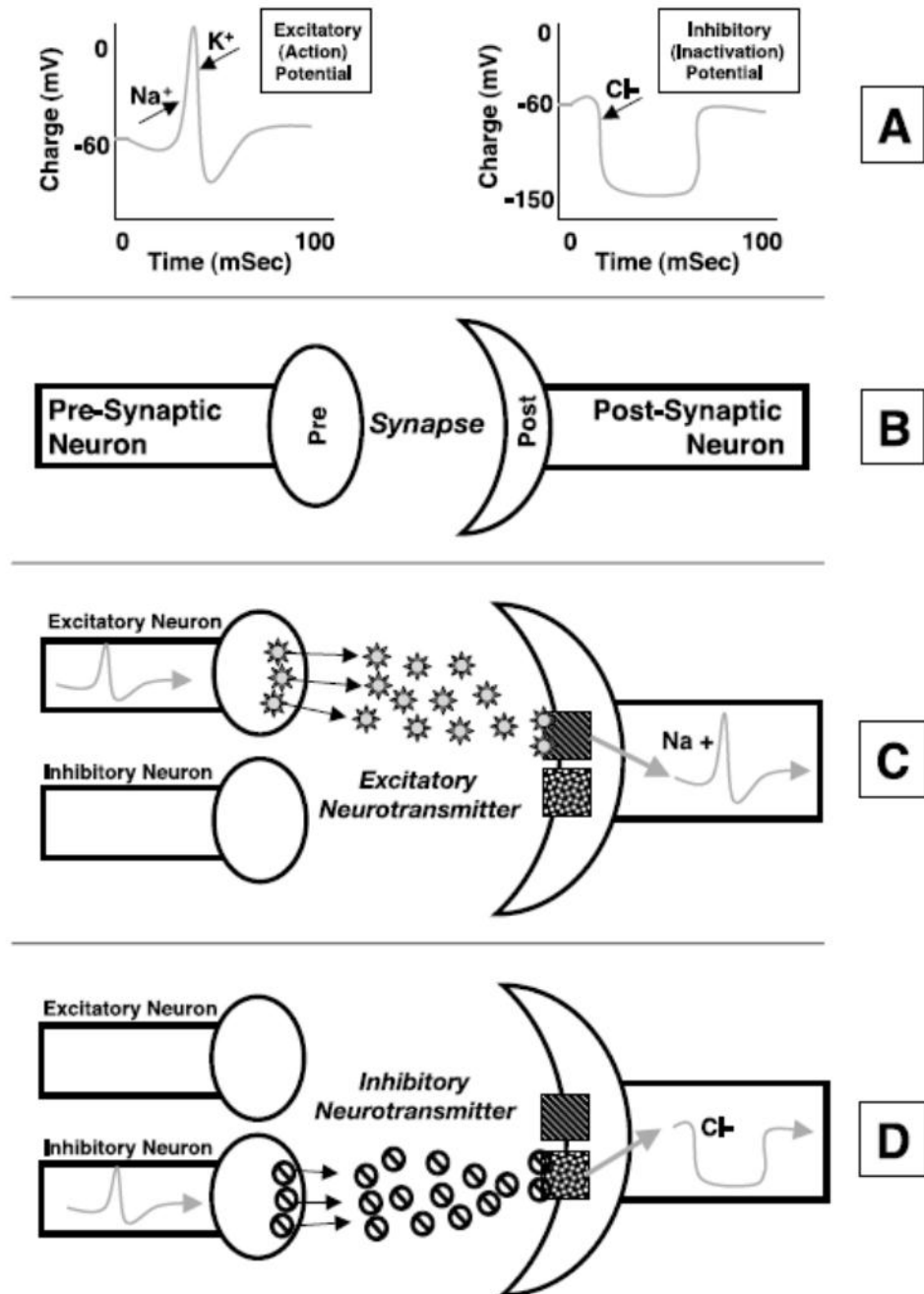
Los insecticidas son productos biocidas utilizados extensivamente para el control de triatominos como parte del control químico (Stenersen,2004)

3.6.1 Efectos Neurotóxicos de los Insecticidas

La neurotoxicidad de los insecticidas ocasiona varios efectos en los insectos conllevando a su mortalidad, estos efectos son clasificados en neuroexcitatorios y neuroinhibitorios. El comportamiento que se observa en los insectos por el efecto neuroexcitatorio son la hiperactividad, los temblores y la parálisis rígida; mientras que los efectos neuroinhibitorios son inmovilidad y parálisis flácida. Los síntomas neuroexcitatorios ocurren más rápidamente, mientras que los síntomas neuroinhibitorios se manifiestan más lentamente. Las causas de mortalidad en insectos expuestos a neurotóxicos, son poco entendidas, pero se asume que en el caso de los síntomas neuroexcitatorios la mortalidad se da por agotamiento de la energía, fatiga neuromuscular por alteración de los equilibrios internos del organismo normalmente controlados por el sistema nervioso (por ejemplo, las concentraciones de lípidos y azúcares en la hemolinfa). El efecto inhibitorio provoca la mortalidad por reducción de la capacidad respiratoria (Scharf, 2003). La Figura 5 muestra la forma de transmisión del impulso nervioso.

Figura 5. Ilustración de la forma de transmisión del impulso nervioso. (A) cambios de la carga sobre el tiempo (en milisegundos) dentro de la neurona, en asociación con el potencial excitatorio “acción” (izquierda) y potencial inhibitorio “inactivación” (derecha). Los potenciales de acción son asociados con un flujo de cargas positivas de sodio (Na^+) y del potasio (K^+) fuera de la neurona, y un resultante aumento en la carga cerca de 0 mV a partir de los niveles restantes de aproximadamente -60mV. El potencial de inactivación está asociado con el flujo de cargas cloro negativas (Cl^-) dentro de la neurona, y un aumento resultante de la carga negativa dentro de la neurona. (B) Diagrama de una sinapsis, lugar que separa dos neuronas

(pre y post-sináptica). (C) Liberación del neurotransmisor excitatorio por la llegada de un potencial de acción en la sinapsis de una neurona excitatoria. El neurotransmisor excitatorio (☼) se une a receptores específicos en neuronas post-sinápticas (▨), los cuales estimulan la producción de un nuevo potencial de acción. (D) La liberación del neurotransmisor inhibitorio es estimulado por la llegada de un potencial de acción en la sinapsis de una neurona inhibitoria. El neurotransmisor inhibitorio (⊖) se une a receptores específicos en neuronas post-sinápticas (▩), los cuales conllevan a la inhibición e inactivación del potencial.



Fuente: SHARF, 2003.

3.6.1.1 Sitios de acción de los Insecticidas

Son aquellos sitios bioquímicos o fisiológicos en donde las moléculas insecticidas actúan para producir un efecto tóxico. Algunos sitios blanco de los insecticidas, incluyen la enzima acetilcolinesterasa, canales de sodio dependientes de voltaje, receptores gabaérgicos, canales de cloro dependientes de glutamato, y receptores de butirilacetilcolina. La acción de los insecticidas en estos sitios puede ser la de inhibición de la enzima, actuar como agonista o antagonista de los receptores y la modulación de los canales iónicos (Bisset 2002; Sharf 2003).

a. Enzima acetilcolinesterasa

Es una enzima presente en el sistema nervioso central de los insectos; su función es remover la acetilcolina a partir de su receptor post-sináptico. El resultado de esto, es la iniciación de un potencial de acción seguido por la hidrólisis de acetilcolina en acetato y colina. Los insecticidas organofosforados y carbamatos inhiben esta enzima, lo cual resulta en la unión prolongada de la acetilcolina a su receptor post-sináptico. Finalmente esta acción conduce a la muerte del organismo por una prolongada neuroexcitación. Los organofosforados son de acción inhibitoria más larga e irreversible contra la acetilcolinesterasa, opuesto a lo ocurrido con los carbamatos cuya acción es rápida y reversible (Zerba 1999). Ellos no requieren activación oxidativa para producir toxicidad. Algunos organofosforados deben ser activados enzimáticamente por enzimas oxidasas endógenas (citocromo P450), antes de que ellos sirvan como un efectivo inhibidor de la acetilcolinesterasa. Tanto los organofosforados como los carbamatos poseen una toxicidad relativamente alta (Scharf 2003).

b. Canales de Sodio dependiente de voltaje

Son responsables para la iniciación de potenciales de acción y de recepción en las neuronas, tanto del sistema nervioso central y periférico. Entre los insecticidas que actúan en los canales de sodio, se encuentran el DDT (y

análogos relacionados), piretrinas naturales, piretroides sintéticos y dihidropirazoles. Los canales de sodio se abren y cierran en intervalos precisos basados en propiedades fisiológicas específicas (Scharf 2003).

c. Receptores de Ácido gamma-aminobutírico (GABA) asociados a canales de cloruro y receptores de glutamato

El ácido gamma aminobutírico (GABA) y el glutamato, son neurotransmisores inhibitorios que promueven el flujo de iones cloruro dentro de las neuronas centrales a través de los canales de cloruro. Los insecticidas que activan los canales de cloruro producen neuroexcitación o neuroinhibición de la transmisión de los impulsos nerviosos. En los insecticidas que actúan sobre GABA, se da un bloqueo de la neuroinhibición en las corrientes de cloruro, conduciendo a la neuroexcitación. Algunos de los insecticidas que actúan en este sitio de acción son las ciclodinas, los policlorocicloalcanos y fenilpirazoles como el fipronil.

Los insecticidas que actúan sobre el receptor del glutamato, promueven el incremento de las corrientes de cloruro dentro de las neuronas, esto conlleva a la hiperpolarización y neuroinhibición por la anulación de cargas positivas excitatorias. Ejemplo de estos insecticidas son las avermectinas (insecticidas naturales provenientes de actinomicetos del suelo) (Scharf 2003).

3.6.1.2. Susceptibilidad y resistencia a insecticidas

El concepto de susceptibilidad se utiliza ampliamente en insectos provenientes de cepas susceptibles correspondientes a una colonia establecida en laboratorio (por lo menos cinco generaciones sin aporte externo) o a una colonia recolectada en una zona donde no hubo aplicación de insecticidas por lo menos cinco años atrás (Ministerio Salud Argentina, 2005).

La resistencia se puede definir como el desarrollo en la habilidad de tolerar dosis de tóxicos que pueden ser letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie (WHO, 1957). Según lo citado por Bisset en el 2002, “es una respuesta disminuida de la población de una especie de

animales o plantas a un plaguicida o agente de control como resultado de su aplicación”

El fenómeno de resistencia en insectos, se da principalmente por la presión de los insecticidas en las campañas de control químico (Zerba, 1999; Bisset, 2002).

La resistencia metabólica desempeña un papel importante en la defensa de los insectos ante insecticidas piretroides y organofosforados. En piretroides, la resistencia se ha correlacionado con el aumento del metabolismo por enzimas principalmente del citocromo P450 (Oppenoorth, 1985) y también con el aumento en la degradación de las esterasas (Audino et al., 2004). Estudios toxicológicos realizados con sinergistas de insecticidas como el piperonil butóxido, que inhibe la enzima monooxigenasa (sugiriendo un metabolismo oxidativo) demostró que la resistencia a piretroides observada en cepas resistentes de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* fue relacionada con el aumento de la actividad degradativa de dicha enzima (Audino et al., 2004).

La insensibilidad nerviosa relacionado a la presencia de mutación en el gen *kdr*, es un mecanismo probable de la resistencia a piretroides, esto debe ser estudiado con mayor detenimiento, para observar la relación de esta mutación en dicha resistencia (Santo, 2011).

En organofosforados este mecanismo de resistencia se ha asociado principalmente con las transferasas dependientes de glutation (OMS, 1980). Otros estudios demuestran que la resistencia de insectos a organofosforados como fenitrothion, está relacionado con enzimas esterasas y oxidasas, esto se comprobó al encontrar elevados niveles de estas enzimas en poblaciones de campo venezolanas de *Anopheles aquasalis* resistentes a este insecticida.

3.6.1.3 Mecanismos de resistencia a insecticidas

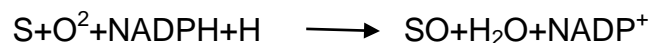
Veamos más a fondo los mecanismos de resistencia a insecticidas:

a. Aceleración del metabolismo del agente tóxico

Entre estos encontramos:

-Oxidasas microsomales

Las oxidasas microsomales están ligadas a la fracción microsómica de las células y se derivan del retículo endoplasmático liso. Casi todos los primeros conocimientos acerca de dichas oxidasas se obtuvieron de investigaciones realizadas en sistemas de mamíferos, pero posteriormente se ha comprobado su existencia en muchos otros organismos, incluyendo a los insectos (OMS, 1980). Las oxidasas microsomales, son relativamente inespecíficas y actúan como catalizadores de la siguiente reacción en general:



En la que S es el insecticida y NADPH es el donador de electrones para la reacción.

Al estudiar las oxidasas microsomales de los insectos se ha reconocido el funcionamiento de un sistema singular de transporte de electrones en que intervienen numerosas formas del citocromo P-450. El grado de actividad de los citocromos de este tipo se puede aumentar por la presencia de otros insecticidas en el medio ambiente, elevando de este modo el grado de protección que proporcionan al insecto (OMS, 1980). El papel que desempeñan las oxidasas microsomales en la resistencia a los insecticidas proviene de los estudios de correlación entre las concentraciones enzimáticas con la resistencia y susceptibilidad a los insectos.

Las oxidasas microsomales poseen las siguientes características (OMS, 1980):

-Metabolizan agentes químicos de muy diversa clase, incluso carbamatos, organofosforados, piretroides y compuestos organoclorados;

- Se encuentran en tejidos “estratégicos” como la grasa del intestino medio;
- Su producción se sincroniza con los períodos de necesidad (la actividad de las oxidasas microsomales llega a su máximo grado durante el período de alimentación de las larvas y desciende hasta la cifra mínima en los insectos adultos (Bisset, 2002).

A diferencia de las esterasas, que se encuentran al azar en los insectos que forman parte de una población, las oxidasas existen en todos los insectos (aunque a veces en cantidades insuficientes para contribuir a la resistencia y constituyen una reserva de la que se puede desarrollar dicha resistencia por selección cuando su actividad aumenta) (Bisset, 2002).

-Hidrolasas, esterasas y transferasas dependientes de glutatión:

Las hidrolasas fosfotriesterasas y las glutatión S-transferasas (STG), forman parte de los mecanismos determinantes de la resistencia en ciertas especies y variedades de insectos a los organofosforados (Bisset, 2002).

En la hidrólisis de los insecticidas organofosforados actúan como mediadoras varias enzimas que causan la degradación del éster fosfórico o del enlace anhídrido, y el resultado final es la eliminación de los metabolitos obtenidos, que siempre son más polares que la molécula original (Bisset, 2002).

Existen diversas formas de STG, pero aún no se ha determinado su número exacto ni sus caracteres específicos. Al parecer su papel es doble: en primer lugar, la conjugación de los electrófilos lesivos con el glutatión nucleófilo endógeno protege las macromoléculas biológicas, como los ácidos nucleicos y las proteínas contra las nocivas consecuencias tóxicas de una reacción covalente; en segundo lugar, las STG aportan un medio efectivo de excretar electrófilos mediante la formación de un compuesto aniónico soluble en agua. La función de las STG en el metabolismo de los insecticidas organofosforados, se observó por primera vez en el metabolismo del metilparatión. Las elevadas concentraciones de STG que se han encontrado en ciertas variedades de insectos resistentes, especialmente en moscas domésticas, parecen estar

relacionadas con el aumento de la actividad de estas transferasas (Bisset 2002). Durante la purificación de las STG de la mosca doméstica se pudo observar que la actividad inespecífica de la esterasa sobre el α - naftil acetato es típicamente paralela al grado de actividad enzimática y es posible que la gran actividad inespecífica de la esterasa que frecuentemente se haya asociada con la resistencia a los organofosforados obedezca en realidad a una actividad elevada de las STG. Esta posibilidad requiere mayores investigaciones. Sin embargo, existen pocas dudas de que la actividad inespecífica de las esterases, que, en electroforesis se manifiesta por la hidrólisis de la α - naftil acetato esté estrechamente relacionada con la resistencia a los organofosforados (Bisset, 2002).

b. Reducción de la susceptibilidad por modificaciones en los sitios de acción por insensibilidad nerviosa

Este mecanismo de resistencia que afecta al DDT y los piretroides entre otros, se ha estudiado principalmente en la mosca doméstica y en los mosquitos, aunque también se presenta en otras especies (Santo, 2011).

En los estudios electrofisiológicos se han obtenido diversas pruebas de relación entre la toxicidad de los piretroides y su acción sobre la sinapsis, algunas de estas son: a. En las formas larvarias de *Culex quinquefasciatus* y adultas de *Anopheles stephensi* y *Musca domestica*, las terminaciones motrices de los nervios son afectadas durante la intoxicación por estos compuestos, b. En la sinapsis, el sitio de acción muestra requerimientos estereoquímicos semejantes a los del sitio donde se produce el efecto tóxico. c. Este sitio de sinapsis es menos susceptible en las variedades de insectos resistentes, d. Este sitio también es afectado por el DDT, que según se cree, actúa en los mismos lugares que son afectados por los piretroides, e. El sitio de acción correspondiente a la sinapsis y el sitio donde ocurre el efecto tóxico tienen un coeficiente de acción de temperatura negativo y reversibilidad térmica (OMS, 1980).

En la resistencia a los piretroides interviene un factor genético, el gen *kdr*, que también se puede expresar con un más alto grado de actividad (*super kdr*) (OMS, 1980). Este gen es recesivo y sólo proporciona un grado limitado de protección a los heterocigotos; por lo tanto se puede esperar que el proceso de selección sea lento, especialmente en poblaciones de insectos en que otros loci (correspondientes a las OFM o a las esterases) pueden aportar mayor protección en el estado heterocigoto. Por tanto la actividad relativamente intensa de los piretroides que se observa sobre las poblaciones de insectos silvestres a pesar de que exista resistencia al DDT, se puede atribuir a una frecuencia relativamente escasa del gen *kdr* (en comparación a la dehidlorinasa en tales poblaciones y las OFM). Sin embargo existe la preocupación de que al mejorar la estabilidad de los nuevos piretroides (permetrina, decametrina, cipermetrina) ante el ataque de las enzimas disminuya la posible intervención de los sistemas dependientes de las oxidasas en la resistencia y esto pueda generar una selección más efectiva del gen *kdr*. Se sabe que la resistencia del gen *kdr* en el estado homocigótico proporciona una protección más allá del alcance de las dosis prácticas de estos nuevos piretroides (Santo, 2011).

La resistencia a los inhibidores del receptor de la colinesterasa (organofosforados, carbamatos) derivada de una disminución de la reactividad de la acetilcolinesterasa es análoga a la resistencia que obedece a la disminución de la sensibilidad del sistema nervioso (OMS, 1980).

En ambos casos este tipo de resistencia parece formarse después de aplicar presiones selectivas extremadamente intensas y sostenidas. Al “sobrecargar” los mecanismos metabólicos de defensa usuales, tal selección hace que domine el mecanismo de insensibilidad, que es considerablemente más “eficiente” (OMS, 1980).

Se ha observado que por lo menos nueve especies de insectos han desarrollado resistencia a causa de una disminución de la reactividad de la acetilcolinesterasa. Ensayos “*in vitro*” realizados en mosquitos, demuestran

diferencias en la colinesterasa de variedades susceptibles al compararlas con variedades resistentes (OMS, 1980).

c. Disminución de la penetración a través de la cutícula

Algunos insectos son resistentes porque cambios en sus cutículas hacen que el ingreso del insecticida sea más lento que en los individuos susceptibles (Bisset, 2002).

El conocimiento de estos procesos de resistencia en poblaciones de campo de triatominos, sentará las bases en la búsqueda de nuevas y eficientes alternativas para el control químico de estos insectos.

3.7 Organofosforados

La alta estabilidad química y el potencial riesgo toxicológico y ecotoxicológico de insecticidas clorados causó su sustitución por componentes más favorables. Tanto los insecticidas organofosforados como los carbamatos se convirtieron en una mejor alternativa, ya que no eran tan persistentes químicamente, lo que los hace no bioacumulables y por lo tanto insecticidas adecuados para el control de vectores de la Enfermedad de Chagas (Zerba, 1999).

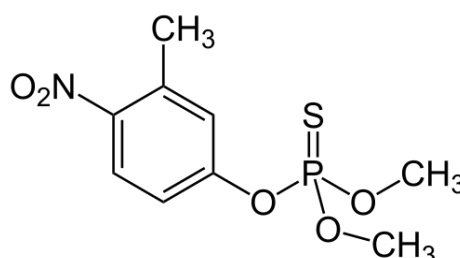
En Colombia, los compuestos organofosforados son utilizados como plaguicidas y son aplicados ampliamente en diferentes campos, principalmente en la agricultura para mejorar la calidad y la cantidad de los alimentos, a nivel doméstico para eliminar insectos y a nivel de la salud pública, para el control de vectores transmisores de enfermedades. Entre los efectos adversos que se pueden citar están la contaminación ambiental y la toxicidad para los humanos. Los compuestos organofosforados, son considerados ésteres del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol) y de sus derivados, generalmente liposolubles (Publicación INCAP MDE-025). El mecanismo de acción de todos los organofosforados es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La acetilcolina es liberada de la terminal presináptica para que se pueda unir a

su receptor en la neurona postsináptica o en el órgano blanco. Después se disocia rápidamente del receptor y es hidrolizada por la acetilcolinesterasa (AChE) en acetato y colina. La inactivación de la AChE por los organofosforados, resulta en un aumento en la concentración de acetilcolina en la sinapsis, resultando en sobrestimulación de las neuronas postsinápticas y los órganos efectores blanco. Los organofosforados inhiben la función de la colinesterasa al formar un complejo enzima-inhibidor reversible. Este complejo se puede degradar espontáneamente permitiendo que la enzima sea reactivada o puede ir a un proceso llamado envejecimiento; ésta, es una reacción de alquilación dependiente de tiempo que resulta en una inactivación irreversible de la enzima (Plazas y Olarte, 2011; OMS, 2009; Zerba, 1999).

3.7.1 Fenitrotión

El nombre IUPAC de este principio activo organofosforado es O, O-dimetil O-4-nitro-m-tolil fosforotioato Como lo descrito por Gualtieri y colaboradores, este insecticida es de origen japonés y se utiliza en salud pública hace varios años. Se ha utilizado en la lucha contra los triatominos tanto en el laboratorio como en campo en varios países suramericanos desde la década de los 80's con buenos resultados tanto en su acción inmediata como residual y en su poder ovicida (Zerba et al., 1997), posteriormente, se empezaría a utilizar masivamente en el control de la enfermedad de Chagas. Su fórmula química es: C₉H₁₂NO₅PS y su estructura se representa en la Figura 6.

Figura 6. Estructura conformacional del fenitrotión.



Fuente: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fenitrothion>

Este insecticida tiene la desventaja de presentar un fuerte y desagradable olor por lo cual, los habitantes de los domicilios prefieren usarlo fuera de las casas y en estructuras peridomésticas (Zerba, 1999).

La aplicación de insecticidas en el control de las poblaciones domiciliarias es esencial para poder registrar su efectividad en el control de especies silvestres que están haciendo intrusión a las viviendas pudiendo evaluar el comportamiento de individuos de campo de *P. geniculatus* frente a compuestos activos de insecticidas.

3.8 Piretroides

Las herramientas de control químico más exitosas en el control de triatominos y utilizadas en forma casi exclusiva por las campañas gubernamentales, son los insecticidas piretroides. Los piretroides son análogos sintéticos de las piretrinas producidas por el crisantemo (*Chrysanthemum cinerariifolium*). El extracto obtenido de piretro contiene ésteres del ácido crisantémico (piretrina I, cinerina I, jasmolina I) y ésteres del ácido pirétrico (piretrina II, cinerina II, jasmolina II) (Figura 6). Las piretrinas naturales son una mezcla de la piretrina I y II. Los piretroides tipo I (piretroides de primera generación) como la piretrina y permetrina, no tienen el grupo alfa ciano y son más lábiles a la luz solar, mientras que los piretroides tipo II (piretroides de segunda generación), tales como la cipermetrina, si contienen este grupo alfa ciano, esto los hace más potentes. Los piretroides se comercializan desde mediados del siglo pasado pero durante varias décadas su uso estuvo restringido al interior de las viviendas, porque su vida media en el ambiente era menos de un día (Elliot 1989). En los años 70' se obtuvieron los primeros piretroides fotoestables (tipo II), y se convirtieron en una alternativa para reemplazar a carbamatos y fosforados.

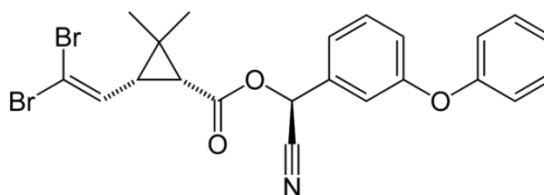
En 1990 se utilizó para el control de la enfermedad de Chagas, un grupo de insecticidas de tercera generación, altamente neurotóxicos pues están enriquecidos en sus isómeros más activos; entre estos podemos encontrar a la betacipermetrina, betaciflutrina, deltametrina y lambda cihalotrina. Este selecto

grupo ha dado resultados exitosos tanto en bioensayos de laboratorio, de campo y en las campañas de control de la Enfermedad de Chagas en países como Argentina (Anadon 2009, WHO 1992, WHO 2002, Zerba 1999).

El sitio de acción primario de los piretroides son los canales de sodio dependiente de voltaje de las membranas neuronales (Zerba 1999, Ruigt 1985). Los piretroides mantienen estos canales abiertos, prolongando la corriente de sodio que ingresa a las neuronas. La prolongada apertura de los canales de sodio causa una despolarización de la membrana. Cuando esta despolarización alcanza el umbral de excitación, la actividad repetitiva puede ser iniciada en varias regiones del sistema nervioso. Los desórdenes neuromusculares causados por la hiperexcitación son la ataxia, convulsiones y eventualmente parálisis inducida por la exposición a piretroides. Hay evidencia que una alteración de solo 1% del número total de canales de Na^+ es suficiente para inducir descargas repetitivas y los síntomas de envenenamiento en animales. Esterioquímica de estos compuestos tiene gran efecto en su eficacia. Varios piretroides existen en diversas formas isoméricas que presentan distintas propiedades toxicológicas. Dichos isómeros pueden ser ópticos y geométricos y presentan muy diferentes actividades insecticidas (Naumann, 1990). Generalmente los isómeros cis son más tóxicos que los isómeros trans (Narahashi 1996). Algunos piretroides son mezclas de isómeros que presentan distintas toxicidades. De esta manera, un producto puede contener moléculas muy tóxicas para los insectos mezcladas con moléculas muy poco tóxicas. Además, pueden ocurrir interacciones toxicológicas entre los componentes de las mezclas (potenciación, aditividad, antagonismo). Al estudiar la toxicidad individual y conjunta de los isómeros cis y trans de cipermetrina en *T. infestans*, se encontró que la aplicación simultánea de ambos isómeros produce un fenómeno de antagonismo, es decir que la toxicidad de la mezcla es menor que la suma de las toxicidades individuales (Alzogaray, 2003). La toxicidad de los piretroides aumenta al disminuir la temperatura ambiental (Ruigt 1985). Los piretroides pueden mostrar sinergismo a algunas sustancias como el butóxido de piperonilo (PBO) (aplicado en dosis no tóxicas, aumenta la toxicidad de los insecticidas de 10 a 300 veces) ya que

inhibe a las oxidasas microsomales de función mixta que metabolizan a los piretroides (Bradberry 2005, Casida et al. 1983). La primera manifestación de la intoxicación con piretroides en el insecto, es la parálisis del tercer par de patas, seguido por temblores y otros efectos de incoordinación al caminar, afectándose su actividad locomotora (Alzogaray y Zerba, 1993). Los piretroides no producen una muerte rápida, sino que se caracterizan por producir un efecto de “volteo” o knockdown: el insecto recostado sobre su dorso no puede volver a su posición normal, es una parálisis muy rápida y reversible. Los insectos pueden permanecer volteados varias horas o días (según la dosis y la especie) y luego se recuperan (Alzogaray y Zerva 1997). La eficacia de los insecticidas es medida con la mortalidad de los individuos sometidos a ensayos con concentraciones formuladas de éstos y la residualidad se define como la persistencia del insecticida (eficacia) en superficies de material de la vivienda en el tiempo. Los factores que limitan la actividad de los insecticidas incluyen las dosis iniciales, la naturaleza de la superficie rociada, así como la edad de los depósitos de insecticidas y las condiciones ambientales como la temperatura y humedad relativa. El tipo de sustrato, en lo que se refiere a su porosidad, es de importancia particular. En las superficies porosas como el barro, el depósito de insecticida parece perder actividad más rápidamente que en superficies tales como madera, cerámica y azulejos. En el caso de piretroides, la degradación química se puede también esperar en superficies altamente alcalinas y la fotólisis en superficies expuestas a la luz del sol (Alzogaray, 2003). La estructura general de estos insecticidas se observa en la figura 7.

Figura 7. Estructura general de los piretroides (deltametrina)

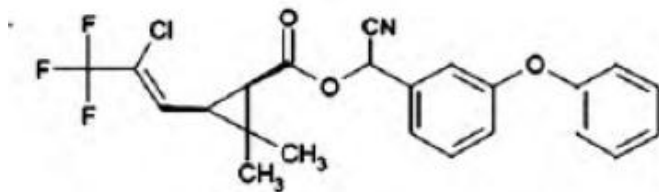


Fuente: Kakko 2004

3.8.1 Lambdacihalotrina

Su fórmula química es $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$, el nombre IUPAC es (*R*)-*a*-ciano-3-fenoxibencil(1 *S*)-cis-3-[(*Z*)-2-cloro-3,3,3-trifluoropropenilo] -2,2-dimetilciclopropanocarboxilato y (*S*)-*a*-ciano-3-fenoxibencil (1 *R*)-cis-3-[(*Z*)-2-cloro-3,3,3-trifluoropropenilo] -2,2-dimetilciclopropanocarboxilato. La Figura 8 muestra la estructura química de la lambdacihalotrina. Como lo descrito por Alzogaray en el 2003, la lambdacihalotrina junto con otros piretorides es un insecticida formulado y en presentación de suspensión concentrada, polvo mojable y concentrado emulsionable, se caracteriza por su poder de volteo, residualidad y propiedades repelentes, actuando sobre los insectos por contacto e ingestión.

Figura 8. Estructura química de la lambdacihalotrina



Fuente: Albaseer et al., 2010.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Obtención de una colonia de campo de *P. geniculatus* utilizando diferentes métodos de captura.

Para la recolección de la cepa de campo de *P. geniculatus* se utilizaron varias estrategias de captura pasiva como la vigilancia comunitaria, trampa con cebo animal tipo Noireau (Noireau et al., 1999), trampa Angulo (Angulo y Esteban, 2011), y trampas con atrayentes químicos (Rojas et al., 2005), así como estrategias de captura activa como las trampas de luz tipo Shannon, captura manual y la vigilancia comunitaria.

4.1.1 Zona de muestreo

Ante los reportes de la comunidad de presencia de triatominos y con el fin de obtener el material necesario para establecer la colonia de campo de *P. geniculatus*, se realizó la captura de triatominos en el barrio Villa del Prado, ubicado en la periferia de la escarpa que rodea la ciudad de Bucaramanga, (Figura 9). Debido a que con las capturas realizadas en el barrio Villa de Prado de Bucaramanga no se pudo establecer una colonia de *P. geniculatus*, se revisó la base de datos de ingreso de triatominos y se seleccionó la vereda Chorreras (Figura 9) del municipio de Capitanejo, ubicado a 197 Km de la ciudad de Bucaramanga.

Figura 9. Zonas de muestreo de *P. geniculatus*. Panorámica del barrio Villa del Prado, Bucaramanga (izquierda) y de la vereda Chorreras, Capitanejo (derecha).



4.1.2 Métodos de captura

a. Vigilancia comunitaria: se realizó charlas informativas (Figura 10 y 11) acerca de la Enfermedad de Chagas y cuidados para la recolección de los insectos a los habitantes de las zonas seleccionadas (Villa del Prado-Bucaramanga, Chorreras-Capitanejo); para la recolección de triatominos a los habitantes de las viviendas se les dio frascos plásticos que se diligenciaron con los datos de captura y entregados a un habitante del barrio encargado del envío inmediato al laboratorio de entomología del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander (CINTROP/UIS). En la vereda de Chorreras Capitanejo, se dejó a cargo de la búsqueda activa de *P. geniculatus* a la líder comunitaria Estefany Cordero, quién por aproximadamente un año estuvo enviando insectos con los que se logró establecer la cría de esta cepa de campo.

Figura 10. Socialización en el Barrio Villa del Prado (Bucaramanga) sobre la enfermedad de Chagas y sensibilización para la vigilancia comunitaria



Para la salida de campo que se realizó en la vereda de Chorreras, se utilizó una estrategia pedagógica que consistió en la elaboración de una figura de *P. geniculatus* hecha con algunos materiales como papel y cartón paja con el fin de facilitar el aprendizaje y la búsqueda de este vector por parte de los niños de la comunidad, este material fue diseñado y realizado por el grupo de entomología del CINTROP.

Figura 11. Socialización con los estudiantes de la institución educativa “La Chorrera” Chorreras-Capitanejo acerca de la Enfermedad de Chagas y el papel esencial de los niños en la vigilancia comunitaria del vector



b. Trampas de Luz: se hicieron capturas de triatominos con trampas de luz tipo Shannon (1939) por 3 noches al mes (entre Febrero 3, 2011 y Enero 4, 2012) durante la transición de la fase lunar de menguante a Luna nueva, de 6 pm a 6 am (Castro et al., 2010) en la Cañada del Loro del Barrio Villa del Prado-Bucaramanga. Para esto, se determinaron 3 puntos en línea diagonal a una distancia de 50 metros entre cada punto para la ubicación de cada una de las trampas por día. Adicionalmente y de la misma forma, se realizó captura con esta misma trampa en la Vereda de Chorreras-Capitanejo, Santander durante la semana del 20-25 de febrero del 2012. En la Figura 12 se muestra la ubicación de las trampas Shannon en los lugares de muestreo.

Figura 12. Trampa de luz Shannon. Barrio Villa del Prado-Bucaramanga (izquierda), Vereda Chorreras-Capitanejo/Santander (derecha)

Trampa de luz Shannon



c. Trampas con cebo animal: se ubicaron 2 trampas tipo Angulo (Angulo y Esteban, 2011) y 4 trampas Noireau (Noireau et al., 1999) tanto en la cañada del loro del Barrio Villa del Prado como en la vereda Chorreras-Capitanejo en sitios estratégicos para la captura de esta especie (troncos y raíces de árboles, cuevas de rocas, madrigueras, cuevas de murciélagos), se dejaron por 24 horas al cabo de las cuales se recogió y se identificó el material capturado. En la Figura 13 se observan algunas de estas trampas:

Figura 13. Trampas con cebo animal en la vereda de Chorreras-Capitanejo trampa Noireau con cebo animal (*Mus musculus*) y trampa Angulo con cebo animal (*Gallus gallus*)

Trampa Noireau



d. Trampas con atrayentes químicos (feromonas):

Las trampas cebadas con atrayentes son herramienta utilizadas en muchos programas de manejo integrado de plagas. Su uso se acrecentó a partir del descubrimiento, aislamiento y síntesis de las feromonas y de otros atrayentes que median en la conducta de los artrópodos, en particular de los insectos (Barrera et al., 2006). Como lo citado por Rojas en el 2005, entre las feromonas sexuales o de cópula, varios autores han sugerido su presencia en triatominos sobre la base de estudios de comportamiento y electrofisiológicos. Sustancias químicas como benzaldehídos y aldehídos alifáticos son consideradas feromonas relacionadas con el comportamiento sexual de triatominos (Fontan, 2002).

Para aplicar está estrategia de captura, se utilizó una adaptación de la trampa Noireau: en 8 trampas se incluyeron viales de 2 ml adheridos a las paredes de la trampa (Figura 14) con 1.5 ml de compuestos orgánicos utilizados como

atrayentes. Los semioquímicos a utilizar fueron los aldehídos alifáticos: Nonanal ($M = 142,4 \text{ g/mol}$), Heptanal ($M = 114, \text{ g/mol}$), el aldehído aromático Benzaldehído ($M = 106. 12 \text{ g/mol}$), y el Alcohol Isoamílico ($M = 88,15 \text{ g/mol}$), la concentración de los semioquímicos es la sugerida por la casa comercial Merck para garantizar la eficiencia de su aplicación, ya que estos compuestos son utilizados en campo y son de rápida aspersion en el ambiente. (Rojas et al., 2005). Las trampas se ubicaron en lugares con posibles indicios de presencia de *P. geniculatus* (Reyes, 2009).

Figura 14. Trampa Noireau, en su interior vial con 1.5 ml de atrayente químico



e. *Captura manual*

Se realizó inspección y recolección manual en lugares alrededor de las viviendas de las zonas seleccionadas para el estudio. La Figura 15 muestra las actividades del grupo de trabajo en las zonas de muestreo.

Figura 15. Colecta manual de triatominos. Grupo CINTROP-UIS en Barrio Villa del Prado-Bucaramanga (arriba) y en la vereda Chorreras-Capitanejo (abajo).



4.1.3 Condiciones ambientales

Para determinar las condiciones ambientales, se utilizaron los datos registrados por la Corporación de defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMB) para el año 2011. Para la zona de Capitanejo, no se logró información climática debido a que no se visitó la estación meteorológica encargada de registrar estos datos (Duitama, Boyacá). Tampoco se tuvo acceso a los datos en la página web del IDEAM (<http://institucional.ideam.gov.co/jsp/index.jsf>).

4.1.4 Recolección del material

Los individuos capturados se colocaron en recipientes plásticos, etiquetados (Figura 16) y transportados al laboratorio de Entomología del CINTROP-UIS ubicado en Piedecuesta, y se determinaron taxonómicamente mediante la clave de Lent y Wygodzinsky (1979).

Figura 16. Recipientes para la recolección de triatominos



4.1.5 Colonización y Cría en laboratorio:

Los insectos silvestres capturados en la zona de estudio se mantuvieron en condiciones ambientales constantes de laboratorio a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 75-80% de humedad relativa, fotoperiodo 12:12 y se ofreció para su alimentación cada 8 días, sangre de gallina (*Gallus gallus*), y de ratón (*Mus musculus*- cepa BALB/c) inmovilizados. Se obtuvo su postura y los huevos se ubicaron en varios sustratos con el fin de determinar el mejor de ellos para la eclosión de las ninfas. Luego de la eclosión, las ninfas N1 se separaron cada una en un frasco plástico debidamente etiquetado con un abanico de soporte dentro y un adulto muerto como fuente de endosimbiontes (Villacis et al., 2008). Después de la eclosión de las ninfas de primer estadio, estas se alimentaron hasta lograr su primera alimentación; y posteriormente con una alimentación semanal. (Figura 17)

Figura 17. Alimentación con sangre de gallina (*Gallus gallus*) y de ratón (*Mus musculus*) de triatominos recolectados en campo



4.1.6 Cría de ninfas para ensayos biológicos

Las poblaciones de *P. geniculatus* utilizadas para los ensayos biológicos fueron:

-*P. geniculatus* de laboratorio, Molagavita 2003

La cepa de laboratorio se obtuvo a partir de *P. geniculatus* procedente del municipio de Molagavita en el 2003. Ninfas I eclosionadas en sustrato con algodón humedecido, se utilizaron para ensayos con los principios activos insecticidas.

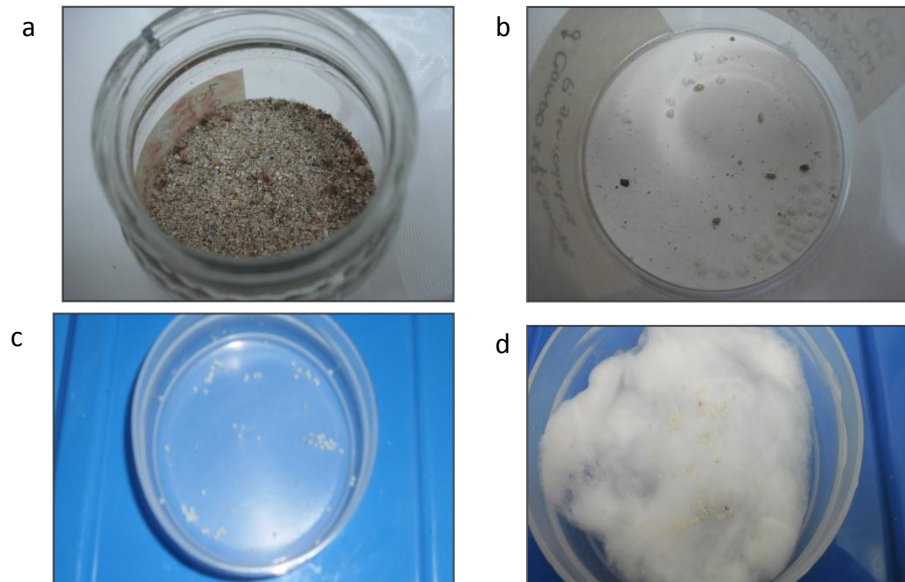
-*P. geniculatus* de campo, Chorreras 2012

Los insectos capturados en campo en la vereda de Chorreras, municipio de Capitanejo, Santander, se ubicaron en un recipiente y luego de la copula y la postura, los huevos que se obtuvieron a diario se trasladaron a diferentes sustratos como arena estéril, algodón humedecido, yeso y recipiente sin sustrato (Figura 18), hasta su eclosión. Las ninfas de primer estadio (F1) emergidas se utilizaron para los ensayos con los principios activos insecticidas (Reyes Jerez et al., 2009). Solo unas pocas ninfas se dejaron para obtener la F2 de esta cepa de campo (n = 40). Vale la pena anotar que de los 27 insectos de *P. geniculatus* capturados y procesados por examen directo y PCR, solo se utilizaron 18 insectos para poder obtener la colonia de campo de Capitanejo

2012. Los 9 insectos restantes murieron durante el proceso de transporte o cría en el laboratorio.

Figura 18. Diferentes medios para la eclosión de las N1 de la cepa de campo.

a. arena estéril, b. con yeso, c. sin nada, d. con algodón humedecido



-*P. geniculatus* de campo F3, Santander 2010

Adicionalmente, se utilizó una población de *P. geniculatus* de campo de la generación 3 (F3), Santander 2010, los huevos de los adultos de la generación 2 (F2) se ubicaron en varios sustratos (vidrio, pelos de cabra, plumas, papel y arena) para su eclosión. Las ninfas de primer estadio (F3) emergidas se utilizaron para los ensayos con los principios activos insecticidas (Reyes Jerez et al., 2009).

4.2 Determinación de la infección natural por *Trypanosoma cruzi* en la población de campo de *Panstrongylus geniculatus*

Para determinar la infección natural por *T. cruzi* de los individuos capturados se utilizaron las siguientes técnicas:

4.2.1 Examen directo

Los triatominos capturados en campo se analizaron por examen directo a través de la visualización de 400X al microscopio óptico marca Carl Zeiss de muestra de deyección fresca de *P. geniculatus* obtenida luego de su alimentación y diluida 1:1 en 50 µl de solución salina de cloruro de sodio (NaCl) al 0.85% para evidenciar la infección natural por *Trypanosoma* sp. (Figura 19).

Figura 19. Visualización al microscopio de *Trypanosoma* sp. en heces de *P. geniculatus*



4.2.2 Extracción de ADN y PCR

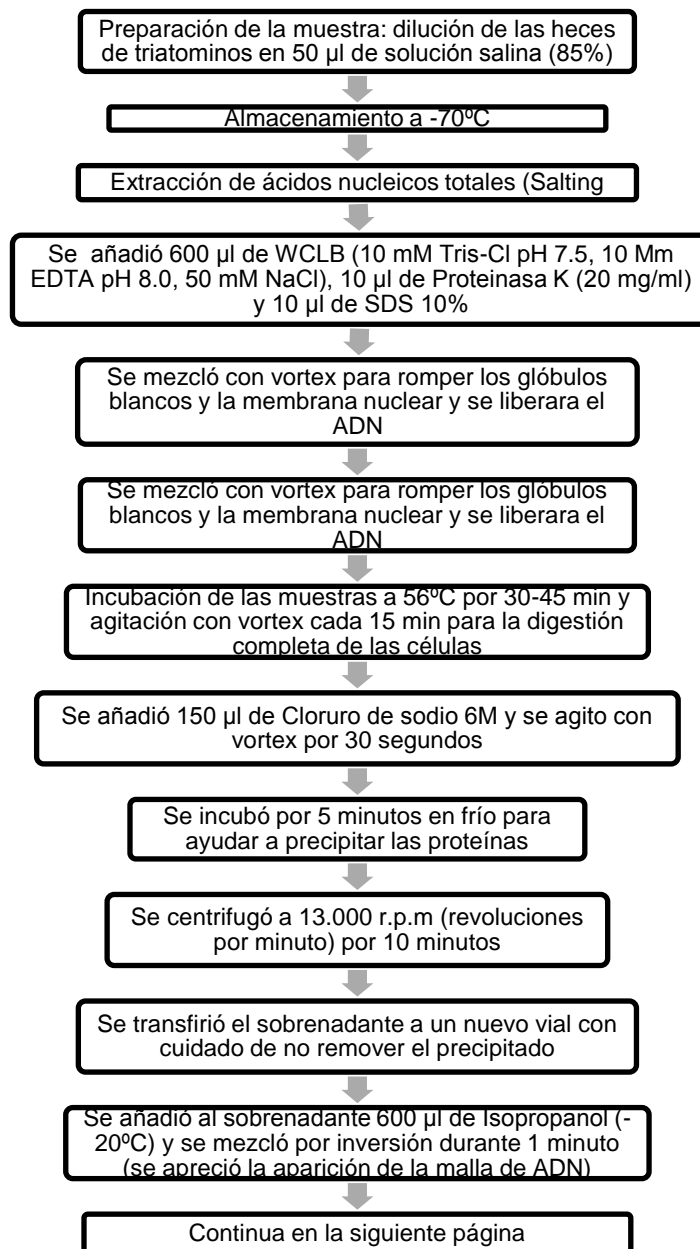
Luego de realizar el examen directo de las muestras, se tomó 200 µl de la dilución de las heces con solución salina y se almacenó en un vial de 2 ml a -70°C para su utilización en el diagnóstico de infección natural por *T. cruzi* a través de PCR. El procesamiento de las muestras por dicha técnica, se realizó con el asesoramiento y colaboración del grupo de Inmunología y Epidemiología molecular de la Universidad Industrial de Santander, dirigido por la doctora Clara Isabel Gonzalez Rugeles PhD. La estandarización del protocolo de determinación de *T. cruzi* en heces de triatominos estuvo a cargo de la doctora Martha Lucia Díaz M.Sc., esto fue necesario para la determinación de la infección natural por *T. cruzi* en muestras de *P. geniculatus* provenientes de campo.

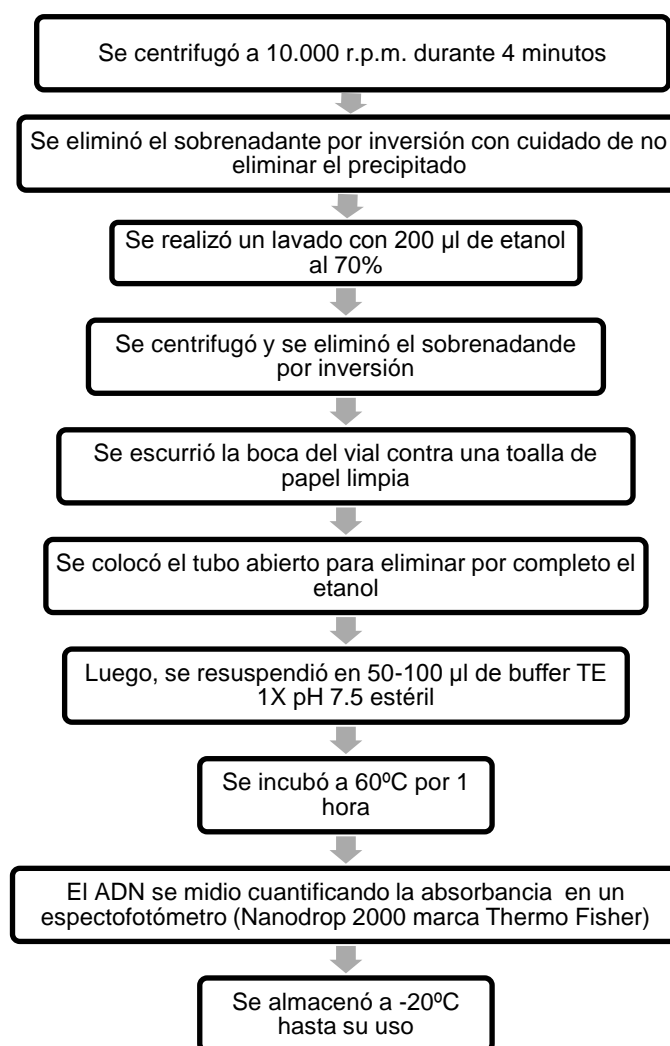
La infección natural por *Trypanosoma cruzi* se confirmó por extracción y amplificación del ADN. Para la aplicación de esta, se utilizaron 9 muestras de heces obtenidas en el Barrio Villa del Prado-Bucaramanga (2 muestras provenientes de *P. geniculatus* capturados en la cañada del loro). Adicionalmente, se procesaron catorce muestras obtenidas a partir de heces de *R. pallescens* capturados en esta misma zona. De la vereda de Chorreras-Capitanejo, Santander se procesaron 27 muestras de heces de *P. geniculatus* capturados.

-Extracción del ADN

Para la extracción del ADN, se siguió el protocolo recomendado por Miller y colaboradores en 1988 (método de Salting out), con algunas modificaciones: (figura 20).

Figura 20. Extracción de ADN a través del método de Salting out (Miller et al., 1988) a partir de heces de triatominos





-PCR

Para la amplificación del DNA nuclear de *T. cruzi* de la muestra se realizó el protocolo descrito por Moser y colaboradores (Moser et al., 1989). Brevemente: se utilizaron los primers específicos TCZ1 (primer directo) 5`-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3` y TCZ2 (primer reverso) 5`-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3`. Estos primers permitieron la amplificación de una región repetida de 188 pb del ADN nuclear satelital de *T. Cruzi*. Las condiciones de reacción fueron: desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) 0,4 µl/ml, primers 0,1 µl/ml, Cloruro de Magnesio 1,2 µl/ml y Tucan Taq 0,12 µl/ml. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C,

por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, finalizando con una extensión a 72°C durante 10 minutos. Posteriormente los productos amplificados fueron electroforados en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidipara visualizarse con la luz Ultravioleta (UV) del transiluminado (Moser, 1989).

4.3 Líneas bases de susceptibilidad de los insecticidas en ninfas susceptibles de primer estadio de *Panstrongylus geniculatus*

4.3.1 Material entomológico

-Cepa susceptible de laboratorio, Molagavita 2003:

La estandarización de la línea de susceptibilidad a principios activos de insecticidas organofosforados y piretroides se realizó con insectos de la cepa susceptible de laboratorio de *P. geniculatus* procedente del municipio de Molagavita en el 2003 y mantenida en el laboratorio CINTROP-UIS por más de 9 años, sin el contacto de ninguna sustancia insecticida (Figura 21).

-Cepa de campo F1, Capitanejo 2012

También, se utilizó una cepa de campo *P. geniculatus* generación 1 (F1) recolectada en la vereda Chorreras, Municipio de Capitanejo durante el 2012 (Figura 21).

-Cepa de campo F3, Santander 2010

Adicionalmente, fue conformada una cepa denominada Santander, a partir de insectos únicos procedentes de varios municipios del departamento de Santander como son: Cabrera, Chorreras, Floridablanca y Bucaramanga; estos insectos (generación 2: F2) se colonizaron en condiciones de laboratorio, para obtener ninfas de primer estadio de la generación 3: F3; y calcular las líneas de

susceptibilidad a los principios activos insecticidas. Estos resultados fueron comparados con los resultados obtenidos en la cepa campo-Capitanejo 2012 y la cepa susceptible de laboratorio Molagavita 2003 de *P.geniculatus*.

Figura 21. Adultos de *P. geniculatus* de una cepa de laboratorio colonizada en el año 2003 proveniente del municipio de Molagavita (izquierda), adultos de *P. geniculatus* de una cepa de campo generación 2 (F2) proveniente de 4 municipios de Santander en el 2010 (centro) y adultos de *P. geniculatus* de una cepa de campo proveniente de Chorreras-Capitanejo en el 2012 (izquierda)



4.3.2 Insecticidas

Se utilizaron los principios activos con grado técnico lambdacihalotrina (0.1 g y 98% de pureza) y fenitrotión (0.25 g y 98% de pureza), adquiridos por importación de laboratorios del Doctor Ehrenstorfer, Augsburg-Alemania en el 2010 (Figura 22).

Figura 22. Principios activos lambdacihalotrina y fenitrotión



4.3.3 Técnica de Aplicación tópica:

Se utilizaron ninfas de primer estadio eclosionadas entre 24 y 36 horas antes, con un peso promedio de 1,1 mg (cepa de laboratorio y cepa de campo F3), y 1,8 mg (cepa F1 de campo) y se topicaron en la parte dorsal del abdomen con 0.1 µl de ingredientes activos disueltos en acetona con ayuda de microjeringas Hamilton provista de descargador repetitivo (MIN SALUD ARGENTINA, 2005). Para los ensayos se seleccionaron 10 ninfas de la cepa de laboratorio, y 6 ninfas de la F1 de campo (con menor número de ninfas N1 eclosionadas por provenir de una colonia más reducida), por dosis y por repetición. De la cepa de campo F3, Santander 2010, se tomaron entre 8 y 10 ninfas por ensayo (Figura 23). En un primer ensayo se usaron cuatro niveles de dosis con un factor 1/10 entre cada dosis y en los ensayos finales se usaron más de cinco niveles de dosis intermedias que registraron entre 10 y 90% de mortalidad (0,08; 0,06; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005 ng/i para cepa susceptible de laboratorio y cepa de campo F3, Santander 2010 y 3; 2,5; 2; 1; 0,8; 0,6 ng/i para la población F1 de campo Chorreras 2012 con lambda-cihalotrina) (2,5; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,1 ng/i para cepa susceptible de laboratorio y cepa de campo F3, Santander 2010 y 2,5; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,5 para la población F1 de campo, Chorreras 2012 con fenitrotión). Se trataron grupos de insectos controles con el mismo volumen de acetona para análisis. Los insectos se colocaron en un recipiente con papel plegado en su interior y se cubrieron con muselina. Se realizaron al menos tres réplicas independientes de cada ensayo en distintos días. Los frascos fueron colocados dentro de la incubadora marca INTECMA Ltda. con una temperatura de 25°C y 50-75% HR, según requerimientos (MIN SALUD ARGENTINA, 2005). Los ensayos se realizaron en horas de la tarde.

Figura 23. N1 de *P. geniculatus* para ensayos con insecticidas



4.3.4 Criterios de muerte

Se consideró muerto al insecto que colocado sobre un papel filtro no presento actividad locomotora propia, ya sea en forma espontánea o cuando se estimuló por un pincel o pinza (Figura 24) (OMS, 1994).

Figura 24. N1 de *P. geniculatus* afectadas por el insecticida



4.3.5 Análisis estadístico:

-Líneas de susceptibilidad

Se utilizaron los datos de mortalidad a las 48 horas en ninfas 1 de *P. geniculatus* para fenitrotión como el tiempo calculado para la efectividad de este insecticida (OMS 1994) y 72 horas para lambda cihalotrina, teniendo en cuenta el efecto knockdown ocasionado por los piretroides en poblaciones de insectos (Alzogaray y Zerva 1997). Para cálculos de los parámetros

estadísticos DL_{50} y DL_{99} según método probit (Litchfieldy Wilcoxon 1949) y los respectivos intervalos de confianza del 95%. Todos los parámetros se expresaron en ng de ingrediente activo por insecto. Los parámetros DL_{50} y DL_{99} (dosis letal para el 50% y 99% de los insectos tratados respectivamente), se establecieron utilizando el programa POLO PLUS -Probit and Logit Analysis Versión 2.0 (LeOra Software, 2007). Se consideraron significativamente diferentes los valores de DL_{50} cuyos IC 95% no se solaparon. Se calculo los valores de X^2 (Chi cuadrado) para cada concentración. Si el X^2 calculado es menor que el valor de X^2 crítico, se concluye que la línea trazada al ojo es la línea de regresión correspondiente a los valores observados con 95% de confianza. Este análisis expresa el grado de distribución de los valores observados alrededor de la recta.

4.4 Perfiles de resistencia a los principios activos de los insecticidas en ninfas de primer estadio de una cepa de campo de *P. geniculatus*

El estado de la susceptibilidad y/o resistencia de *P. geniculatus* a los principios activos insecticidas lambdacihalotrina (piretoride) y fenitrotión (organofosforado) de la cepa F1 de campo, Chorreras 2012, se comparó respecto a la cepa susceptible de laboratorio, Molagavita 2003, CINTROP/UIS, para determinar los niveles o grados de resistencia.

Para esto, se usaron N1 (ninfas en el primer estadio) provenientes de la colonia susceptible de laboratorio y de la primera generación (F1) del material recolectado en campo. En caso de detectarse menor susceptibilidad en el material de campo, trabajar con la F1 asegura que esta diferencia tiene un origen genético y por lo tanto se puede considerar una genuina resistencia. Se usaron N1 de la F1 para acortar la demora entre el momento de recolección de material a campo y la realización del ensayo.

Las ninfas 1 de campo tenían 2-3 días de eclosionar y en ayunas.

Luego en ninfas 1 provenientes de la cepa de laboratorio se determina la curva dosis-mortalidad del principio activo insecticida por el método de aplicación tópica pero con un volumen de aplicación de 0,1 μ l.

Según la línea base de susceptibilidad determinada en la cepa de laboratorio se establece una dosis discriminante equivalente a la DL₉₉ de esta cepa. Se utilizaron 6N1 provenientes de insectos recolectados en campo (F1) y se expusieron a la dosis discriminante. La supervivencia reiterada (por lo menos un superviviente en dos de 3 ensayos) de los insectos expuestos indico el desarrollo de resistencia y justifico la determinación de grado de resistencia. Para determinar el grado de resistencia (GR), se determinó las DL₅₀ para N1 de cepas de laboratorio y de campo resistente. La resistencia se determinó teniendo en cuenta los IC 95% de los GR como lo descrito por Robertson y Preisler (1992). Los valores de Grado de Resistencia (GR) fueron calculados como el cociente entre la DL50 de cada insecticida en la población de campo y la DL50 del mismo insecticida en la cepa de laboratorio.

$$GR = \frac{DL_{50} \text{ Cepa de Campo}}{DL_{50} \text{ Cepa de Laboratorio}}$$

Para la interpretación de estos resultados, se tiene en cuenta que si los IC95% contienen al valor uno, el valor de Grado de Resistencia no es significativamente distinto que uno y entonces no hay resistencia; si no lo contiene, el Grado de Resistencia es significativamente diferente que uno y por lo tanto hay resistencia (Robertson y Preisler 1992). Se clasificará el nivel de resistencia de acuerdo a la clasificación propuesta por Torres y colaboradores en el 2002 (Torres-Vila et al., 2002): susceptibilidad=1; baja resistencia: 2-10; resistencia moderada: 11-30; alta resistencia: 31-100.

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La manipulación de los animales en experimentación y la bioseguridad del estudio se llevaron a cabo según los siguientes lineamientos:

Animales: Se tendrán en cuenta las disposiciones de la Ley 84 de 1989, capítulo VI, artículos 23 (literales a, b, c) y 24 del estatuto nacional de protección de los animales y que regula el uso de animales vivos en experimentos e investigación; así como la normatividad en la investigación biomédica con animales expuesta en el título V de la Resolución No. 008430 de 1993, artículos 87 (literales c, d, e, f, g, i, j y k), 89, 92 y 93. Así mismo, para el cuidado, manejo, mantenimiento y sacrificio de animales se tendrán en cuenta los protocolos y recomendaciones del IACUC (Institutional Animal Care and Use Committe 2002) de la Universidad de Minnesota, en AVMA (American Veterinary Medical Association 2013), para la eutanasia y las recomendaciones sobre las buenas prácticas en la administración de sustancias y sangría de animales expuestas en el artículo EFPIA (The European Federation of Pharmaceutical Industries Associations /ECVAM (The European Center for the Validation of Alternative Methods).

Insectos: Se regirá de acuerdo a la resolución No. 008430 de 1993 emanada del Ministerio de Salud de la República de Colombia título IV, en su capítulo I, sobre la Bioseguridad de las investigaciones y el manejo de material biológico que pueda contener microorganismos patógenos en los Artículos 63, 67 (c) y 71.

Los alcances del decreto número 039 de 2000 por el cual se reglamenta la investigación científica sobre diversidad biológica en Colombia que en su artículo 2 se refiere a: "Permiso de estudio con fines de investigación científica. Las personas naturales o jurídicas que pretendan adelantar un proyecto de investigación científica en diversidad biológica que involucre alguna o todas las actividades de colecta, recolecta, captura, caza, pesca, manipulación del recurso biológico y su movilización en el territorio nacional, deberán obtener permiso de estudio, el cual incluirá todas las actividades solicitadas", también especifica en su artículo primero que: "Las disposiciones de este decreto no

serán aplicables a las investigaciones o prácticas docentes que se realicen en materia de salud y agricultura, excepto cuando éstas involucren especímenes o muestras de fauna y/o flora silvestres" y por tanto no es aplicable a este estudio. Seres humanos: No se utilizaran seres humanos en los ensayos, por lo tanto no se prevé riesgo

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de una colonia de campo de *P. geniculatus* utilizando diferentes métodos de captura.

6.1.1 *P. geniculatus* capturados

El número de *P. geniculatus* recolectados en los lugares de muestreo (barrio Villa del Prado, Bucaramanga y vereda Chorreras, Capitanejo) por captura manual, colecta alumbrado público, trampa de luz Shannon, vigilancia comunitaria, trampas con cebo animal (trampa Angulo y Noireau) y trampa con atrayentes químicos, se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. *P. geniculatus* recolectados por captura manual, colecta alumbrado público, trampa de luz Shannon, vigilancia comunitaria, trampas con cebo animal y trampa con atrayentes químicos en el barrio Villa del Prado, municipio de Bucaramanga, Santander durante el año 2011

Método	Especie	Lugar de captura	de	Estadio	Total	Porcentaje de captura (%)
Captura manual	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio		-*	0	0
Colecta Alumbrado público	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio		2 machos 1 hembra	3	30
Trampa de Luz Shannon	<i>P. geniculatus</i>	Extadomicilio		2 hembras	2	20
Vigilancia comunitaria	<i>P. geniculatus</i>	Intradomicilio		1 macho 4 hembras	5	50
Trampa Angulo	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio-		-*	0	0
Trampa Noireau con cebo animal	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio		-*	0	0
Trampa Noireau con feromonas	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio		-*	0	0

-*:No se halló *P. geniculatus* con este método de captura

El mejor método de captura en esta zona fue la vigilancia comunitaria (50% captura), ya que se recolectaron cinco *P. geniculatus* de 10 totales.

Es importante resaltar que con la trampa Angulo se logró capturar *R. pallescens* (n=31:13 machos, 3 hembras, 1N5, 1N4, 3N3, 6N2, 4N1); este triatomino ha tomado importancia epidemiológica debido a que al igual que *P. geniculatus* ha cambiado sus hábitos silvestres para hacer intrusión a los domicilios humanos.

Tabla 2. *P. geniculatus* recolectados por colecta manual, trampa de luz Shannon, vigilancia comunitaria, trampas con cebo animal y trampas con atrayentes químicos en la vereda Chorreras-Capitanejo, Santander

Método	Especie	Lugar de captura	Estadios	Total	Porcentaje de captura (%)
Colecta manual	<i>P. geniculatus</i>	Intradomicilio	2 machos	2	7.4
Trampa de luz Shannon	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio	1 macho	1	3.7
Vigilancia comunitaria	<i>P. geniculatus</i>	Intradomicilio peridomicilio	19 machos 5 hembras	24	89
Trampa Angulo	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio-	-*	0	0
Trampa Noireau con cebo animal	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio	-*	0	0
Trampa Noireau con atrayentes químicos	<i>P. geniculatus</i>	Peridomicilio	-*	0	0

*: No se halló *P. geniculatus* con este método de captura

En este lugar, el método de captura más eficiente fue la vigilancia comunitaria (89% captura) con veinticuatro *P. geniculatus* recolectados de veintisiete en total.

6.1.2 Condiciones ambientales

Las condiciones reportadas por la Corporación de Defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMB) durante las fechas y lugares de captura, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos Meteorológicos CDMB en los días de captura. Año 2011

Fecha captura triatominos	Hora	HR día captura (%)	T° día cáptura (°C)	Precitación día captura	H Prom. diaria (%)	T° Prom. diaria (°C)	Precip. Prom. diaria (mm)
03/02/2011	8:20 PM	70.9	21.2	0	67.9	22.02	0
03/03/2011	9:15 PM	87.2	18.2	0	82.1	18.96	0.7
01/04/2011	9:17 PM	77.9	21.3	0	75.94	22.25	0
19/04/2011	10:00 PM	88.3	18.3	0.7	78.95	20.33	0.1
21/04/2011	8:05 PM	84.2	18.7	0.1	82.80	19.4	0.23
09/05/2011	9:00 PM	82.4	20.3	0	77.18	21.4	0.02
03/06/2011	8:48 PM	82.8	19.3	0	82.63	19.67	0.08
22/06/2011	9:00 PM	80.9	20	0	74.09	21.39	0.01
28/08/2011	8:30 PM	82	21	0	*	*	0
23/12/2011	8:06 PM	83	21.9	0.1	*	*	0.1
Promedio total		81.96	20.02	0.09	77.7	20.67	0.124

*: Datos no obtenidos

Fueron consultados los datos meteorológicos del municipio de Capitanejo para el primer semestre del año 2012 en el IDEAM Bucaramanga, sin embargo el Instituto no cuenta con la información de esta zona del departamento de Santander.

6.1.3 Colonización y cría de *P. geniculatus* de campo

Colonización

Basados en los resultados de la captura, se procedió a la colonización y cría de *P. geniculatus* de campo.

Se debe mencionar que con los insectos recolectados en el barrio Villa del Prado- Bucaramanga, no se logró obtener colonia, ya que los individuos se morían a los pocos días de llegar al laboratorio (15-20 días), a pesar de que se

les suministró las condiciones necesarias para su cría (humedad \geq 75% y alimentación cada 5 días con ratón (*Mus musculus*) y gallina (*Gallus gallus*).

Con los insectos recolectados en la vereda Chorreras-Capitanejo se obtuvo la cría de ninfas 1 con la cual se realizaron los ensayos para establecer la línea de susceptibilidad a lambdacihalotrina y fenitrotión

Cría en laboratorio

El número de huevos depositados por los adultos de *P. geniculatus* capturados en campo se ubicaron en diferentes sustratos que resultaron en la eclosión de ninfas 1. Los resultados del porcentaje de eclosión en dichos sustratos, se resume en la Tabla 4:

Tabla 4. Porcentaje de eclosión de huevos de *P. geniculatus* provenientes de Chorreras, Capitanejo mantenidas en los sustratos de arena húmeda estéril, yeso, algodón humedecido y sin sustrato.

Sustrato	No. huevos	No. N1 eclosionadas	Porcentaje de eclosión (%)
Arena húmeda estéril	670	447	67
Yeso	69	31	45
Algodón humedecido	92	25	27
Sin sustrato	218	112	51
Total	1049	615	59

Tabla 5.Significancia de los valores del porcentaje de eclosión en diferentes sustratos en ninfas N1 de *P. geniculatus*.

Chi² significativo a p<0,005 (x)	Arena húmeda estéril	Yeso	Algodón humedecido	Sin sustrato
Arena húmeda estéril	1	x	x	x
Yeso	x	1	x	-
Algodón humedecido	x	x	1	x
Sin sustrato	x	-	x	1

X: datos con diferencias significativas. -: datos sin diferencias significativas

Los huevos obtenidos por adultos de la cepa susceptible de laboratorio-Molagavita 2003 fueron ubicados en superficies con algodón humedecido. Vale la pena anotar que se obtuvo gran cantidad de ninfas 1 de esta cepa (más de 500 N1 semanales), ya que se tiene una colonia bien establecida en el laboratorio del CINTROP (Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales), por lo que no hubo necesidad de cambiar el sustrato a uno más eficiente. Los huevos obtenidos de la cepa de campo de la generación 3 (F3) - Santander 2010, fueron ubicados en varios sustratos (vidrio, papel, plumas, pelo y arena), el porcentaje de eclosión para dichos sustratos respectivamente fue 46,67%; 52,94%; 45,54%; 71,43%y 77,61%, esta comparación dio como resultado a la superficie con arena (77, 61%) como el mejor sustrato para la eclosión de huevos de esta cepa de campo F3 de *P. geniculatus*. Este registro fue válido para elegir los sustratos de eclosión de los huevos de la cepa de campo F1 (Grupo CINTROP, comunicación personal). Por tanto, el mejor sustrato para la eclosión de ninfas 1 de *P. geniculatus*, fue la arena húmeda estéril (67%).Se registraron diferencias significativas entre los sustratos de arena húmeda estéril, yeso, algodón humedecido y sin sustrato. Los sustratos

en yeso y sin sustratos no mostrarán diferencias significativas entre sus porcentajes de eclosión (ver Tabla 5).

6.2 Determinación de la infección natural por *T. cruzi* en la población de campo de *Panstrongylus geniculatus*

Infección natural por Examen directo

Los resultados de la infección natural luego del examen directo y la PCR de *P. geniculatus* recolectados en campo se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la infección natural por *T. cruzi* a través de examen directo y PCR en *P. geniculatus* recolectados en Villa del Prado, Bucaramanga y Chorreras, Capitanejo.

Zonas de captura de <i>P.geniculatus</i>	No. de insectos capturados	No. de muestras procesadas	No. muestras positivas por Examen Directo y PCR		Porcentaje de Infección natural por Examen Directo y PCR
			Examen directo	PCR	
Villa del Prado (Bucaramanga)	10	9	Examen directo	5	56
			PCR	5	56
Chorreras-Capitanejo	27	27	Examen directo	9	33.3
			PCR	12	44.4
Santander 2010	4	π	Examen directo	π	π
			PCR	π	π

π: muestras no procesadas por examen directo o PCR

La Tabla 6 muestra que para el barrio Villa del Prado, se procesaron 9 de las 10 muestras recolectadas, la muestra que no se procesó se encontraba en un estado muy deteriorado y fue imposible realizar cualquier tipo de diagnóstico para infección natural por *T. cruzi*. En el caso de las muestras recolectadas en la vereda Chorreras, Capitanejo, se procesaron el total de individuos capturados (n=27). El número de muestras de Villa del Prado que resultaron positivas por examen directo fue 5 (50% del total), este resultado fue similar al diagnóstico por PCR (50% positividad para *T. cruzi*). Las muestras procedentes de Chorreras, Capitanejo fueron 33,3% positivas por examen directo para la infección por *T. cruzi*. Los resultados de infección natural de esta cepa por

PCR, dieron una positividad del 44,4%. En la cepa Santander 2010 no se realizaron análisis de PCR ni examen directo por que se contaba con un número muy reducido de triatomino colectados (n = 4), además no se había realizado el contacto con el grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Universidad de Santander para el procesamiento de estas muestras.

-PCR en heces de *P. geniculatus* recolectados en campo

El resultado de PCR para determinar la infección natural por *T. cruzi*, se evidencio a través de geles de electroforesis utilizando el marcador molecular PUC que señala la banda de 190 pb (Figura 25 y 26), la cual indica la positividad de la muestra.

Figura 25. Amplificación de ADN de *T. cruzi* en heces de *P. geniculatus* y *R. pallescens*, recolectados en Villa del Prado, Bucaramanga (B) y otros municipios de Santander como: L: Lebrija, SV: San Vicente, Cb: Cabrera, F: Floridablanca, RN: Rionegro y C: Capitanejo. MP: marcador de peso molecular (PUC 19DNA/mspl), C-: ADN Martha Díaz, C+: ADN cepa JCR. +: Muestras positivas para infección por *T. cruzi* en heces de triatomino. Las letras representadas en color rojo corresponden a muestras de heces de *P. geniculatus*, las de color naranja a muestras de *R. pallescens*.

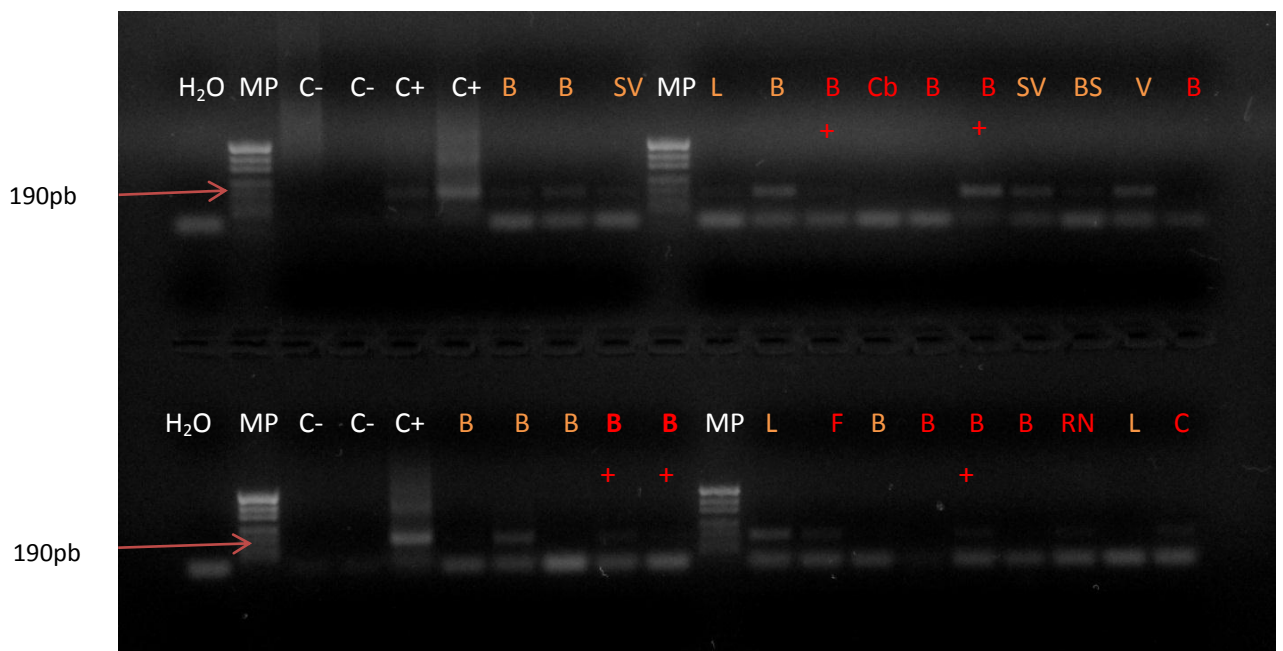
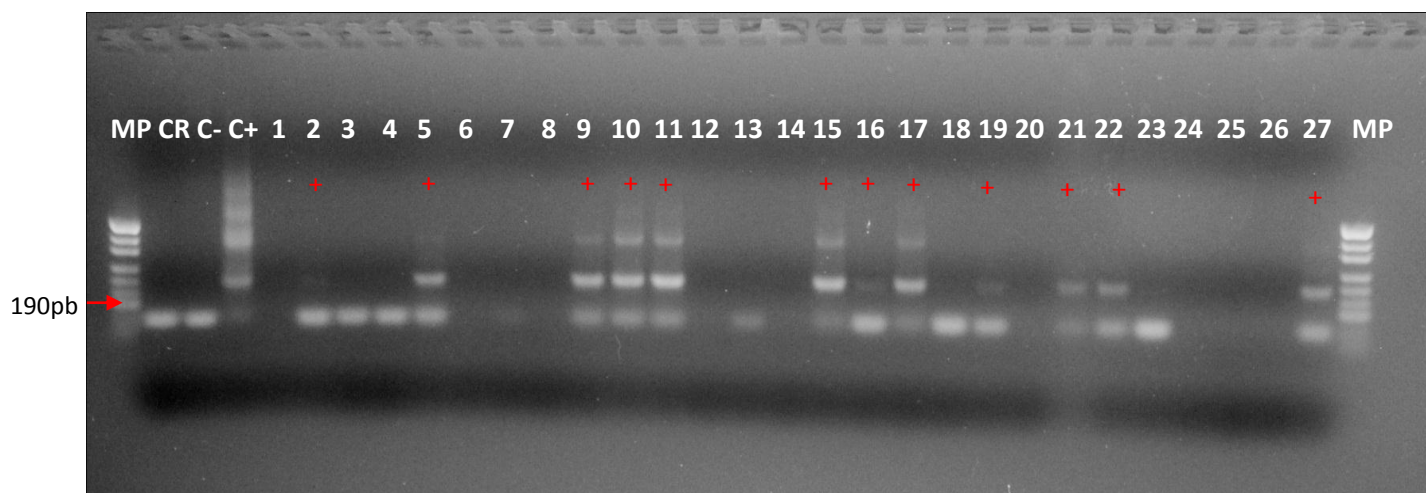


Figura 26. Amplificación de ADN de *T. cruzi* en heces de *P. geniculatus* recolectado en la vereda Chorreras, municipio de Capitanejo, Santander. +: Muestras positivas para infección por *T. cruzi*. MP: marcador de peso molecular (PUC 19DNA/mspl), CR: control de reacción, C-: ADN Angela Torres, C+: ADN cepa JCR



6.3 Establecimiento de las líneas bases de susceptibilidad de los insecticidas en ninfas susceptibles de primer estadio de *P. geniculatus*

El resultado de las líneas de susceptibilidad para los principios activos de lambdacihalotrina y fenitrotión en las poblaciones de laboratorio, de campo F1 y de campo F3 de *P. geniculatus*, se representa en la Tabla 7 y 8.

Tabla 7. Nivel de susceptibilidad en ninfas de estadio 1 de *P. geniculatus*, cepa susceptible de laboratorio-Molagavita 2003, población de campo F1-Chorreras 2012 y cepa de campo F3-Santander 2010 a la aplicación tópica de lambdacihalotrina. (Datos obtenidos con el programa POLO PLUS Probit and Logit Analysis Versión 2.0).

Población	n	X ²	DL ₅₀ (ng/insecto)	IC 95%	DL ₉₉ (ng/insecto)	IC 95%	Pendiente + EE	GR
Cepa susceptible de laboratorio Molagavita 2003 CINTROP-UIS	350	0,209	0,024 ^{a,b}	0,021- 0,028	0,131	0,097- 0,201	3,188± 0,316	
Cepa de campo F1 Chorreras 2012	250	0,989	1,194 ^a	1,002- 1,404	5,764	4,021- 10,727	3,402± 0,491	48.9* (39,2- 60,9)
Cepa de campo F3 Santander 2010	350	1,241	0,030 ^b	0,026- 0,035	0,151	0,112- 0,233	3,328± 0,338	1,2 (1-1,5)

GR: grado de resistencia. En la última columna, los valores señalados con un asterisco son significativamente distintos a la unidad. a: valores con diferencias significativas; b: valores con diferencias no significativas, X²=chi cuadrado.

La tabla 7 muestra que los resultados de la DL₅₀ y la DL₉₉ para la cepa susceptible de laboratorio y la cepa de campo F3-Santander 2010, no fueron significativamente diferentes ya que hubo solapamiento en los valores de los intervalos de confianza del 95% para dichos valores. En el caso de la comparación entre las DL₅₀ de la cepa susceptible de laboratorio con la cepa de campo F1, Chorreras 2012, se demostró que hay diferencias significativas en estos valores ya que no se presentó solapamiento entre los valores de los IC 95%. En el caso de la DL₉₉, los resultados fueron similares a los registrados para la DL₅₀, demostrando las diferencias significativas entre la cepa

susceptible de laboratorio y la cepa de campo F1-Chorreras 2012. El valor de las pendientes fue mayor a 3 (<3) en todas las poblaciones de *P. geniculatus* evaluadas. El X^2 calculado en todas las poblaciones evaluadas fue menor que el valor de X^2 crítico, demostrando el ajuste de estos valores a la línea de regresión correspondientes a los valores observados con el 95% de confiabilidad.

Tabla 8. Nivel de susceptibilidad en ninfas de estadio 1 de *P. geniculatus*, cepa susceptible de laboratorio, cepa de campo F1 Chorreras 2012-Capitanejo y cepa de campo F3 -Santander 2010 a la aplicación tópica de fenitrotión (datos obtenidos con el programa POLO PLUS Probit and Logit Analysis Versión 2.0)

Población	n	X^2	DL ₅₀ (ng/insecto)	IC 95%	DL ₉₉ (ng/insecto)	IC 95%	Pendiente + EE	GR
Cepa de laboratorio Molagavita 2003 CINTROP-UIS	300	2,166	0,482 ^{a,b}	0,387- 0,590	5,471 ^{a,b}	3,564- 10,276	2,205± 0,233	
Cepa de campo F1 Chorreras 2012	200	0,879	1,476 ^a	1,254- 1,786	7,354 ^b	4,691- 17,580	3,336± 0,563	3,06* (2,3-4)
Cepa de campo F3 Santander 2010	300	1,174	0,528 ^b	0,411- 0,684	8,091 ^b	4,354- 22,853	1,963± 0,266	1,09 (0,8- 1,5)

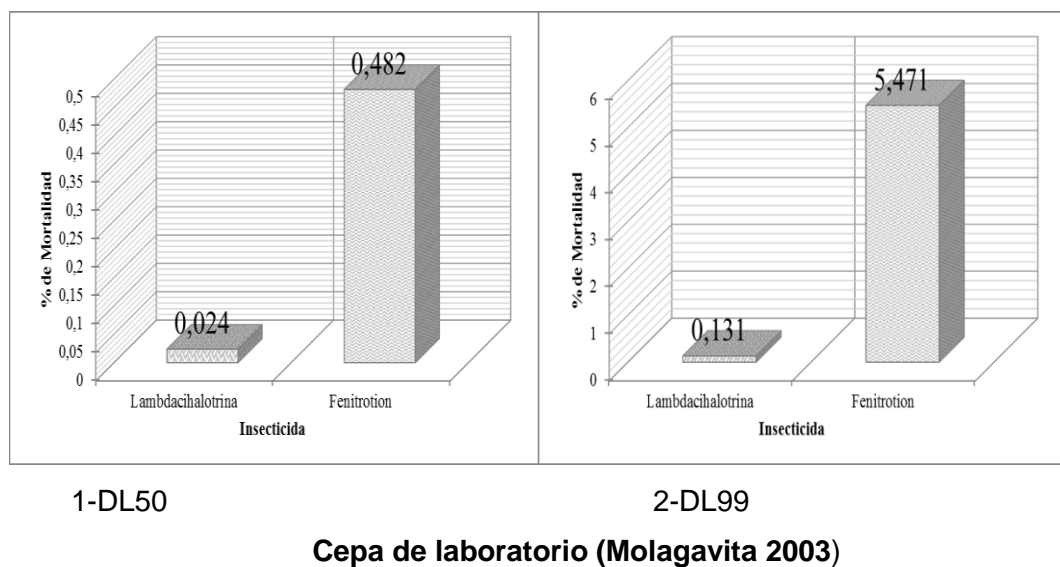
GR: grado de resistencia. En la última columna, los valores señalados con un asterisco son significativamente distintos a la unidad. a: valores con diferencias significativas; b: valores con diferencias no significativas, X^2 =chi cuadrado.

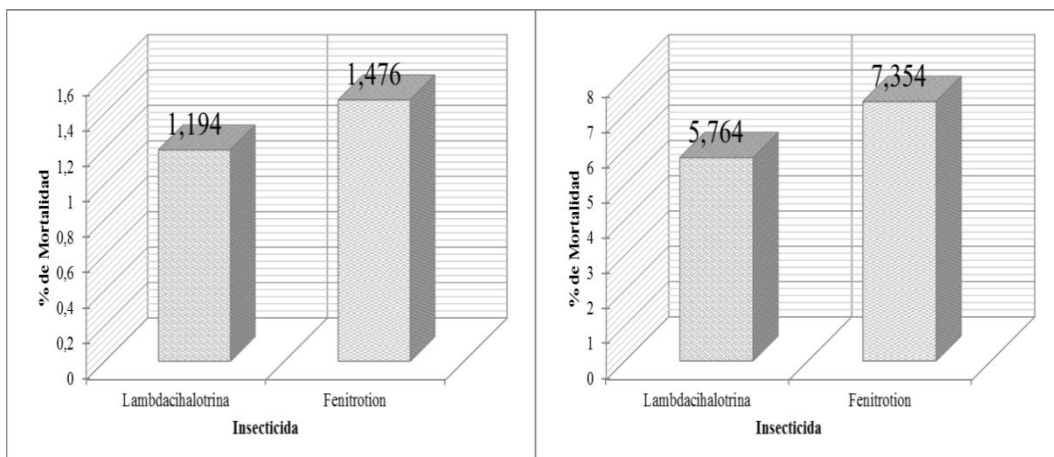
La tabla 8 muestra que los resultados de la DL₅₀ para la cepa susceptible de laboratorio y la cepa de campo F3, Santander 2010, no fueron significativamente diferentes ya que los intervalos de confianza del 95% de dichos valores se solaparon. En el caso de la comparación entre las DL₅₀ de la

cepa susceptible de laboratorio con la cepa de campo F1-Chorreras 2012, se demostró que hay diferencias significativas en estos valores pues los valores de los IC 95% no se solaparon. En el caso de la DL₉₉, los valores (IC 95%) se solaparon en todas las poblaciones evaluadas. El valor de las pendientes fue menor a 3 (<3) en la cepa susceptible de laboratorio y en la cepa F3-Santander 2010. En la población de campo F1, el valor de la pendiente fue mayor a 3 (>3). El X² calculado en todas las poblaciones evaluadas fue menor que el valor de X² crítico, demostrando el ajuste de estos valores a la línea de regresión correspondientes a los valores observados con el 95% de confiabilidad.

Al comparar el efecto de cada uno de los principios activos sobre la población susceptible de laboratorio-Molagavita 2003, de campo-Capitanejo 2012, y en la cepa de campo adicional F3 -Santander 2010 de *P. geniculatus* se observaron los siguientes resultados (Figura 27):

Figura 27. Comparación de DL₅₀ y DL₉₉ a los principios activos lambdacihalotrina y fenitrotión sobre una cepa susceptible de laboratorio-Molagavita 2003, cepa de campo-Capitanejo 2012 y una cepa adicional de campo F3-Santander 2010 en ninfas 1 de *P. geniculatus*

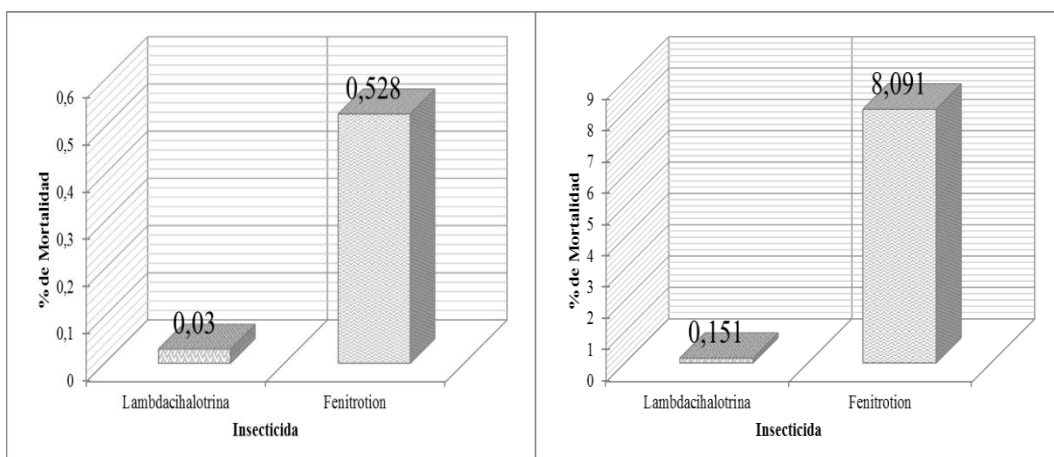




1-DL₅₀

2-DL₉₉

Ceba de campo F1 (Capitanejo 2012)



1-DL₅₀

2-DL₉₉

Ceba de campo F3 (Santander 2010)

La figura 27 muestra que para la cepa susceptible de laboratorio, el efecto insecticida de lambdacihalotrina es muy superior al de fenitrotión, ya que se necesitó menor cantidad del piretroide para alcanzar la DL₅₀ y la DL₉₉ en *P. geniculatus*. En la cepa de campo F1-Capitanejo 2012 también se observó una mayor efectividad del piretroide pero no tan marcado como en la cepa de laboratorio. Los datos adicionales en la cepa de campo F3-Santander 2010 mostraron resultados similares a los obtenidos en la cepa susceptible de laboratorio-Molagavita 2003.

6.4 Establecimiento de los perfiles de resistencia a los principios activos de los insecticidas en ninfas de primer estadio de una cepa de campo de *P. geniculatus*

Perfil de resistencia a lambdacihalotrina

Al realizar la línea de susceptibilidad del principio activo de lambdacihalotrina para la cepa de laboratorio-Molagavita 2003, se observó que la dosis que mató al 99% de los insectos tratados fue de 0,08 ng/insecto, pero al tratar con esta misma dosis a la población F1 proveniente de campo-Chorreras 2012, se observó una mortalidad del 50% y teniendo en cuenta lo recomendado para cuantificar el grado de resistencia (por lo menos una sobreviviente en dos de tres ensayos) (Ministerio Salud de Argentina, 2005; Vassena y Picollo, 2003) se cuantificó el grado de resistencia para esta cepa al compararla con la cepa susceptible de laboratorio para determinar si existía algún nivel de resistencia en la cepa F1 de campo en *P. geniculatus*. Por tanto:

$$GR = \frac{DL_{50} \text{ Cepa de Campo}}{DL_{50} \text{ Cepa de Laboratorio}}$$

$$GR = \frac{1,194}{0,024}$$

$$GR = 49$$

Los resultados mostraron un alto nivel de resistencia (GR=48,9) de la cepa de campo F1, Chorreras 2012 a lambdacihalotrina, al hallar el cociente entre las DL₅₀ de la cepa de campo/ cepa susceptible de laboratorio. Este resultado se señala en la Tabla 7. Los intervalos de confianza (IC 95%) (Robertson y Preisler, 1992) calculados para los grados de resistencia fueron 39,203-60,996.

Perfil de resistencia a fenitrotión

Cuando se determinó la línea de susceptibilidad para el principio activo fenitrotión, se observó que la dosis que mató el 99% de los insectos en la cepa de laboratorio-Molagavita 2003 fue 2 ng/insecto; al aplicar la dosis discriminante en la cepa F1 de campo-Chorreras 2012, el porcentaje de mortalidad fue del 60%, y según lo recomendado para cuantificar el grado de resistencia (por lo menos un superviviente en dos de tres ensayos) (Ministerio Salud de Argentina, 2005; Vassena y Picollo, 2003) se cuantificó el GR por el cociente entre la DL₅₀ de fenitrotión de la cepa de campo F1/DL₅₀ fenitrotión de la cepa susceptible de laboratorio. Por lo tanto:

$$GR = \frac{DL_{50} \text{ Cepa de Campo}}{DL_{50} \text{ Cepa de Laboratorio}}$$

$$GR = \frac{1,476}{0,482}$$

$$GR = 3,06$$

El GR calculado para fenitrotión en la cepa de campo-Chorreras 2012 fue GR= 3,06, catalogándola como una población con una baja resistencia para este organofosforado. Estos resultados se señalan en la Tabla 8. Los intervalos de confianza (IC 95%) (Robertson y Preisler, 1992) calculados para los grados de resistencia fueron 2,335-4,016.

Por lo tanto, los resultados de la tabla 7 señalan que la población de campo F1-Chorreras 2012 es de alta resistencia a lambdacihalotrina (GR= 48,9). La cepa de campo F3 es una cepa susceptible a este piretoride (GR=1,2). Los resultados de la tabla 8 muestran que la población de campo F1-chorreras 2012 registró una baja resistencia a fenitrotión (GR=3,06). La cepa de campo F3 es catalogada como una cepa susceptible a este organofosforado (GR=1,09), (Robertson y Preisler, 1992).

7. DISCUSIÓN

La recolección de *P. geniculatus* en campo demostró la efectividad de algunas técnicas para la captura de triatominos silvestres de captura. La búsqueda activa a través de la vigilancia comunitaria de los vectores demostró ser la estrategia que logró recolectar más triatominos. La vigilancia entomológica brinda información rápida y segura acerca de focos de transmisión activa y la distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas en las diferentes comunidades, las especies presentes y el monitoreo de la tasa de infección natural con *T. cruzi* en los vectores (Guía Vigilancia Entomológica-Instituto Nacional de Salud 2010). Vale la pena resaltar que de los demás métodos de captura, la trampa Shannon también contribuyó a la recolección de individuos (n=3). La eficiencia de este método se basa en la atracción que ejerce la luz sobre los triatominos conllevando a su dispersión activa. La luz eléctrica que usualmente se usa en las viviendas humanas juega un papel importante en la invasión de triatominos silvestres a los ambientes domésticos, lo que a su vez aumenta el riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas (Castro et al., 2010). Los demás métodos de colecta como la trampa Angulo y la trampa Noireau con cebo animal y con feromonas no lograron capturar *P. geniculatus*, y por lo tanto no se pudo determinar el hábitat de estos triatominos; contrario a lo ocurrido con otras especies como es el caso de *R. pallenscens*, de este triatolino se logró capturar algunos insectos en palmas (Familia Aracaceae) con la trampa Angulo, pudiendo confirmar su hábitat.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la cría de la población de *P. geniculatus* de campo, la cepa proveniente de Chorreras-Capitanejo pudo ser colonizada en condiciones de laboratorio, ofreciéndole condiciones óptimas para su cría, como accesibilidad a fuentes de alimento (alimentación con ratón y gallina cada 8 días), temperatura (20°-30°) y humedad relativa (HR)(60-90%), como lo registrado por varios autores (Reyes, 2009; Wolff y González, 1998), para esta especie. A pesar de esto, la cepa proveniente de Villa del Prado no se logró colonizar, aparentemente, porque no se obtuvo de forma simultánea individuos de ambos sexos para la misma población. Los resultados

meteorológicos obtenidos por la CDMB: (T° promedio = 20,02°C y HR promedio = 81,2%) confirman las condiciones ambientales idóneas para el desarrollo de este triatomino, considerándola a su vez en una especie euritérmica, permitiéndole su distribución en un gran número de hábitats (Patterson et al., 2009). La eclosión de los huevos fue mayor en el sustrato con arena humedecida, este garantizó un ambiente de humedad como lo registrado por otros autores en sustratos que mantienen la humedad como el yeso (Wolff y González, 1998), evitando que los huevos se dessequen y puedan eclosionar a N1. En este estudio, el porcentaje de eclosión para la arena húmeda fue del 67% por encima del yeso (45%).

Para diagnosticar la enfermedad de Chagas, se presentan inconvenientes como la baja sensibilidad de los métodos parasitológicos sobre todo en las fases indeterminada y crónica de la enfermedad y la baja especificidad de los métodos inmunológicos. Técnicas como la PCR se han venido utilizando hace algún tiempo, pues es una alternativa diagnóstica debido a su alta especificidad, sensibilidad y rapidez, esta se basa en la amplificación de secuencias repetitivas y específicas del ADN del parásito (Molina-Garza et al., 2007). Como lo citado por Pavia y colaboradores en el 2003, la elección del ADN para diagnóstico, ofrece ventajas como la presencia del ADN del parásito en todas las etapas de su ciclo de vida, además, todos los organismos poseen secuencias de ADN que sirven para su identificación y que a diferencia de las técnicas inmunológicas, este método es independiente de la inmunocompetencia del individuo o de la influencia de infecciones previas. Dicha técnica se ha utilizado también en el diagnóstico de la infección natural de triatominos provenientes de campo, por las ventajas que ofrece sobre las otras técnicas como el examen directo, ya que esta última requiere la presencia del parásito entero (vivo o muerto) para facilitar su identificación dentro de la muestra. Teniendo en cuenta la infección natural por *T. cruzi* en las poblaciones de *P. geniculatus* de campo obtenidas en el barrio Villa del Prado-Bucaramanga, el porcentaje de infección natural mediante PCR fue del 56%, similar a lo observado por examen directo. Con respecto a la cepa de campo de *P. geniculatus* recolectado en la vereda Chorreras, municipio de

Capitanejo/Santander, el porcentaje de infección natural por PCR fue del 44,4%, superior a lo registrado por examen directo (30%), lo que permite deducir una mayor sensibilidad de la técnica de PCR para determinar la infección natural por *T. cruzi* en *P. geniculatus*, reafirmando lo descrito anteriormente. Estos resultados evidencian lo reportado en otros estudios acerca de la alta infección natural por *T. cruzi* en esta especie de triatmino (60%-90%), (Reyes, 2009; Reyes 2010). En este trabajo se determinó infección natural por *T. cruzi* en poblaciones de campo de *P. geniculatus* del 44% hasta del 56%, esto indica el riesgo al que están expuestas las poblaciones humanas que pueden estar en contacto con este insecto.

Por otra parte, los resultados de las DL₅₀ y DL₉₉ para cada uno de los insecticidas demostró una mayor efectividad de la lambdacihalotrina sobre el fenitrotión ya que se necesitó una menor concentración del piretroide para ocasionar la mortalidad en cada una de las poblaciones de *P. geniculatus* evaluadas. Esto confirma las diferencias de efectividad que existen entre los piretroides (lambdacihalotrina) y organofosforados (fenitrotión), similar a lo registrado por otros autores en estudios con ninfas 1 de *T. infestans* susceptibles en donde se registró la diferencia de DL₅₀ entre piretroides y organofosforados (deltametrina 0,13 ng/i, β-cipermetrina 0,24 ng/i y fenitrotion 21,6 ng/i) (Picollo et al., 2005) y en trabajos con ninfas 1 de *T. dimidiata* (deltametrina 0,44 ng/i, betacipermetrina 0,46 ng/i y fenitrotión 16,45 ng/i) y *T. maculata* (deltametrina 0,07 ng/i, betacipermetrina 0,05 ng/i y fenitrotion 4,12 ng/i) (Reyes Jerez et al., 2007), esto reafirma la acción triatomicida de los piretroides (Zerba, 1997). Vale la pena resaltar que en la cepa de campo F1 - Capitanejo 2012, la respuesta insecticida de lambdacihalotrina y fenitrotión fue similar, aunque mayor en el piretroide, confirmando la resistencia de la cepa ante estos dos insecticidas. No se realizó análisis de las pendientes ya que la conclusión de un metanálisis realizado hace algunos años señala que la pendiente de la recta dosis-respuesta no es un buen indicador de la susceptibilidad a insecticidas (Chilcutt y Tabahsnik, 1995), además los resultados de este trabajo no coinciden con lo planteado acerca de las observaciones de las pendientes citado por Soto Vivas en el 2001, en donde

menciona que algunos autores (Georghiou, 1983; Saume 1992) han señalado que cepas con pendientes elevadas (≤ 3) son susceptibles al insecticida evaluado. Por lo contrario, los valores de las pendientes para la cepa de campo F1-Chorreras 2012, fueron mayores a 3 en una cepa considerada como resistente tanto para lambdacihalotrina como para fenitrotión.

Al comparar la respuesta de las cepas de *P. geniculatus* evaluadas con los dos principios activos, se observó que para lambdacihalotrina (DL_{50} y DL_{99}), la cepa de laboratorio-Molagavita 2003, fue la más susceptible ($DL_{50}=0,024$ ng/insecto y $DL_{99}=0,131$ ng/i). Este resultado pudo obedecer a que esta cepa se ha mantenido en el laboratorio desde el 2003 y desde entonces ha estado libre de contacto con cualquier insecticida, lo que indica que no ha sido sometida a ninguna presión de selección por insecticidas. Teniendo en cuenta la cepa F1 de campo-Chorreras-Capitanejo 2012, los resultados de la DL_{50} y DL_{99} para lambdacihalotrina fueron muy superiores a los observados en la cepa susceptible de laboratorio, demostrando una menor eficacia de lambdacihalotrina sobre la cepa de campo, registrando resistencia al comparar sus valores de DL_{50} con los valores de DL_{50} obtenidos en la cepa susceptible de laboratorio.

Los resultados con fenitrotión demostraron una menor sensibilidad en las cepas evaluadas, pues se necesitó una mayor cantidad de éste para lograr el 50% y el 99% de mortalidad en ninfas 1. La cepa susceptible de laboratorio registró valores similares a datos adicionales registrados para la cepa de campo F3.

En la cepa F1 de campo los valores para este principio activo fueron más elevados, demostrando una menor sensibilidad para fenitrotión al compararla con las otras dos cepas.

La resistencia de los triatominos a insecticidas ha sido reportada por otros autores (Depickére et al., 2012; Picollo et al., 2005; Santo Orihuela et al., 2008; Zerba 1999) y se puede afirmar que bajo una adecuada presión de selección, cualquier población de insectos es capaz de desarrollar alguna tolerancia a cualquier producto químico utilizado para su control (Molina de Fernández et al., 2004; Vassena y Picollo 2003). La cepa de campo F1 proveniente de la

vereda de Chorrera-Capitanejo, registró un alto grado de resistencia principalmente al principio activo lambdacihalotrina. Para fenitrotión también se registró una baja resistencia en esta cepa F1 al compararla con la cepa susceptible de laboratorio, aunque menor que lo registrado con lambdacihalotrina. El principal soporte económico de los habitantes de este municipio es la agricultura, principalmente la siembra de tabaco, melón, tomate y maíz, productos que necesitan un uso intensificado de plaguicidas, pesticidas y otras sustancias químicas que contribuyen al deterioro de los suelos, el agua y a la inmunización de plagas (Plan de desarrollo municipal, Capitanejo 2008-2011). Esta situación sumada con las fumigaciones realizadas con lambdacihalotrina por parte del personal de ETV (Enfermedades de Transmisión Vectorial) de la Secretaria de Salud de Santander durante el año 2005, probablemente contribuyeron al hallazgo de la resistencia registrada por la cepa de campo F1- Chorreras 2012 para ambos principios activos.

La resistencia a estos principios activos puede responder a fenómenos de resistencia cruzada positiva como lo reportado para otros insecticidas como betacipermetrina, betaciflutrina e incluso para lambdacihalotrina por insecticidas del mismo grupo de piretroides como lo es la deltametrina, pero además se ha indicado que este fenómeno no se presentó entre organofosforados como el fenitrotión (Picollo et al., 2005); los resultados de este estudio, al parecer demuestran lo contrario, pues la cepa de campo F1 demostró resistencia para insecticidas pertenecientes a estos dos grupos, lo que sugiere que no es recomendable usar fenitrotión para el control de *P. geniculatus* de campo resistente a lambdacihalotrina. Por lo tanto, los eventos de resistencia en cepas de campo debido al uso continuo de insecticidas, ocasionan fallas en el control de triatominos en las diferentes zonas del país. Esto indica que al implementar campañas de control de la enfermedad de Chagas, se debe tener información sobre el uso de insecticidas en determinado lugar y la rotación oportuna de insecticidas a nivel regional que permita seleccionar un insecticida eficaz para el control de triatominos en esta zona (Angulo et al.; 2001; Bisset 2002; Vassena y Picollo, 2003). La resistencia a los piretroides en los insectos, se ha correlacionado con el aumento del

metabolismo, principalmente por enzimas (Oppenoorth, 1985), en particular con la actividad del citocromo P450, como lo reportado por Lee y Scott en ensayos con mosca doméstica (*Musca domestica*), en donde se observó resistencia a piretroides (Lee y Scott 1989) y Vassena en el 2002 donde también registró resistencia a piretroides en una población de *T. infestans* del Brasil y en *R. prolixus* de Venezuela, cuyos ensayos con piperonil butóxido (sinergista de insecticidas, inhibe enzimas monooxigenasas) sugirieron un metabolismo oxidativo como causa de la resistencia (Vassena, 2000). En otros estudios, se reportó la presencia de enzimas esterasas específicamente de α -naftil acetato (α -NA) y p-nitro fenil acetato (PNA) involucradas en la resistencia de poblaciones de *Triatoma infestans* en Argentina (Santos Orihuela et al., 2011) y en la resistencia a insecticidas organofosforados (Rodríguez, 2008). Con los datos obtenidos en este trabajo no se puede sacar ninguna conclusión acerca de los mecanismos de resistencia a insecticidas.

El uso de insecticidas en el control de triatominos, sigue siendo la estrategia más efectiva en la lucha contra el mal de Chagas. Según lo descrito por Alzogaray en el 2003, los piretroides se convierten en una herramienta eficiente en el control de estos insectos por su gran selectividad y su alta actividad insecticida que hacen que las dosis usadas no constituyan un riesgo para los mamíferos.

La aplicación de dichas soluciones químicas en el control de las poblaciones domiciliarias y el conocimiento del estado de las susceptibilidad en especies silvestres que están haciendo intrusión a las viviendas, permite evaluar la respuesta de la población de campo de *P. geniculatus* frente a compuestos activos de insecticidas.

El creciente desarrollo de resistencia a insecticidas amenaza esta alternativa, comprometiendo a los programas de control vectorial a implementar la vigilancia periódica de la resistencia en dichas especies. La detección temprana de la resistencia en cepas de campo permite elaborar estrategias de control que disminuyen de esta forma la transmisión de la enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES

El método de captura que demostró mejores resultados en la búsqueda de *P. geniculatus* de campo fue la vigilancia comunitaria. La trampa Shannon también contribuyó a la colecta de triatominos, lo que confirma el papel que desempeña la luz artificial en la dispersión de los triatominos y en el acercamiento de estos insectos a los domicilios humanos.

El medio más efectivo para la eclosión de ninfas N1 de la población de campo de *P. geniculatus* fue la arena húmeda.

Las técnicas de PCR y examen directo demostraron el riesgo de transmisión de *T. cruzi* por *P. geniculatus* de campo a las poblaciones humanas.

El resultado de la línea de susceptibilidad para lambdacihalotrina en la cepa susceptible de laboratorio, Molagavita 2003, fue similar a lo registrado para la cepa de campo F3, Santander 2010, esto evidencia la susceptibilidad de ambas cepas para este insecticida. En la cepa de campo F1, Capitanejo 2012, los resultados demostraron resistencia para este insecticida.

Para el fenitrotión, al comparar las líneas de susceptibilidad de la cepa susceptible de laboratorio con la cepa de campo F3, la primera demostró ser un poco más susceptible a este principio activo. En la cepa de campo F1, se observó baja resistencia a este organofosforado.

Al comparar a fenitrotión con lambdihalotrina en las poblaciones de *P. geniculatus*, se demostró que estas son menos susceptibles a este organofosforado que a la lambdacihalotrina.

Con este trabajo, se logró realizar el monitoreo de la resistencia en una cepa de campo de *P. geniculatus* a los principios activos lambdacihalotrina y fenitrotión.

Se debe tener información sobre el uso de insecticidas en determinado lugar aplicando la rotación oportuna de insecticidas con diferentes modos de acción, evitando el uso o la dependencia total de determinado insecticida para el control de plagas de insectos.

Este trabajo permitió el establecimiento de las líneas base de susceptibilidad por primera vez para esta especie en el país.

El conocimiento de la susceptibilidad a insecticidas en triatominos intrusos es indispensable en el diseño de estrategias utilizadas para el control de la transmisión vectorial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albaseer S, Nageswara R, Swamy Y, Mukkanty K. An overview of sample preparation and extraction of synthetic pyrethroids from water, sediment and soil. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217:5537-5554.
2. Alzogaray R. El control químico de *Triatoma infestans* en Argentina. Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-CITEFA/CONICET), *Revista de Toxicología en línea*, 2003; p.p. 1-18.
3. Alzogaray, R.A.; Font-N, A.; and Zerba, E.N. Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*, 1997, 35: 323-333.
4. Alzogaray R, Zerba E. Incoordination, paralysis and recovery after pyrethroid treatment on nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(3): 431-35.
5. Alzogaray RA, Zerba EN. Temperature effect on the insecticidal activity of pyrethroids on *Triatoma infestans*, 1993 4(3): 485-488.
6. Anadón A, Martínez M,-Larrañaga, M.A. Martínez, *Vet.J*, 2009; 182:7
7. Angulo VM, Esteban L. Nueva trampa para la captura de triatominos en hábitats silvestres y peridomésticos. *Comunicación breve. Biomédica*, 2011; 31: 264-268.
8. Angulo VM, Flórez M, Esteban L. Evaluación del impacto del programa integrado de la infestación domiciliaria por triatominos en Santander. XV

- Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica, 2011; 31(3): 116-117.
9. Angulo VM, Sandoval CM. Triatominos y programa Nacional de Control en Colombia. Monitoreo de la resistencia a Insecticidas América Latina en Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, red latinoamericana de control de triatominos. RELCOT, 2001; p.p. 21-26.
 10. Angulo VM. Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. MVZ CORDOBA, 2000,5: (1): 64-68.
 11. Angulo VM. Programa Integrado de Control de la Infestación domiciliar por Triatominos en seis municipios de Santander. En Control y manejo de la Tripanosomiasis Americana. Memorias, Curso Taller Internacional, 1999; p.p. 121-125.
 12. Audino P, Vassena C, Barrios S, Zerba E, Picollo MI. Role of Enhanced Detoxication in a Deltamethrin-resistant Population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2004; 99(3): 335-339.
 13. AVMA (American Veterinary Medical Association) Revisado 15 abril de 2013. [http:// www.avma.org/disaster](http://www.avma.org/disaster).
 14. Barbosa M, Nunes M. Estratificación del riesgo en la enfermedad de Chagas. *Rev Esp Cardiol*, 2012;65(2):17-21.
 15. Barrera J, Montoya P y Rojas J. Bases para la aplicación de sistemas de trampas y atrayentes en manejo integrado de plagas. Simposio sobre Trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de plagas de importancia económica. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur, 2006, p.p. 1-16.
 16. Benchimol, Barbosa PR. The Oral Transmission of Chagas Disease: an Acute Form of infection Responsible for Regional Outbreaks. *Int J Cardiol*, 2006; 112 (1): 132-133.
 17. Benoit M, Brunaeu P and Meinard C. Comparative activity of tralomethrin and deltamethrin on *Periplaneta Americana*. *Pestic. Biochem. Physiol*, 1985; 26:284-291.
 18. Bisset. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Instituto de Medicina Trópica "Pedro Kouri". *Rev Cubana Medicina Tropical*, 2002; 54(3):202-219.
 19. Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA, *Toxicol*, 2005; 24:93.

20. Briceño-León R. y J.M. Galván JM. The social determinants of Chagas disease and the transformation of Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007; 102 (1): 109-112.
21. C.A. Editora El Nacional, Venezuela. 2009. [Http://el-nacional.com/www/site/p_contenido.php?q=nodo/77611/Gran%20Caracas/Mal-de-Chagas-agudo-afecta-a-80-personas](http://el-nacional.com/www/site/p_contenido.php?q=nodo/77611/Gran%20Caracas/Mal-de-Chagas-agudo-afecta-a-80-personas) [consultado el 13 de Octubre de 2010].
22. Cabello DR, Galíndez. Vital Statistics of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) (Hemiptera: Reduviidae) under Experimental Conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998; 93: 257-262.
23. Cáceres D', Nicholls S., Gualdrón L, Slait E, Dib J et. al. Investigación de un brote de síndrome febril con miocarditis aguda en Guamal, Magdalena, 7 a 11 de junio. *Biomédica* 1999, 19 (3):253 – 9.
24. Campbell DH, Angulo VM, Esteban I, Tarazona Z, Parra GJ, Restrepo M, Restrepo BN, Guhl F, Pinto N, Aguilera G, Wilkinson P and Davies CR. House-level risk factors for triatomine infestation in Colombia. *Int. J. Epidemiol*, 2007; p.p. 1-7.
25. Carrasco HJ, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan Distric.) and neighboring States, Venezuela. *Int J Parasitol*, 2005; 35 (1): 1379-1384.
26. Casabé, N.; Melgar, E.J.; Wood, E.; and Zerba. Insecticidal activity of pyrethroids against *Triatoma infestans*. *Insect Sci. Applic.* 1988: 9: 233-236.
27. Casida JE, Gammon D, Glickman AH, and Lawrance LJ. Mechanism of selective action of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Pharmacology Toxicol*, 1983; 23: 413-438.
28. Castro CM, Barret T, SANTOS W, ABAD F, Rafael J. Attraction of Chagas disease vectors (Triatominae) to artificial light sources in the canopy of primary Amazon rainforest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010; 105(8):1061-1064.
29. Cécere M, Gurtler R, Canale R, Chuit R, Cohen J. El papel del peridomicilio en la eliminación de *Triatoma infestans* de comunidades rurales argentinas. *Bol oficina Sanit Panam*, 1996; 121(1):1-11.
30. Chavasse DC, YAP HH. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases, 1997. WHO/CTD/WHOPES, p.p: 129.

31. Chilcutt and Tabahsnik. Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line: Are they related? *J Econ Entomol* 1995; 88:11-20
32. Corredor A., Santacruz M., Paez S, Guatame LA. Distribución de los triatominos domiciliados en Colombia. Bogotá. Ministerio de Salud; 1990, p.p: 144.
33. Costa J, y Lorenzo. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines- Chagas disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2009; 104 (1): 46-51.
34. Costa Valente. Potential for Domestication of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the Municipality of Muaná, Marajó Island, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999; 94: 399-400.
35. Costa. Valente V, Valente S, Noireau F, Carrasco H, and Miles M. Chagas Disease in the Amazon Basin. Association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with Domestic Pigs. *J. Med. Entomol*, 1998; 35(2):99-103
36. Coura J. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2007; 102 (1): 113-122.
37. Cucunubá Z, Valencia C, Flórez C, León C, Castellanos Y, Cardenas A, Pavía P, Hernández C, Robinson A, Cuervo R, Rios L, Montilla M, Villalobos M, Nicholls S, Puerta C. Pilot program for surveillance of congenital Chagas disease in Colombia 2010-2011 [abstract]. *Int J Infect Dis* 2012;16S1: 53.011
38. Cucunubá Z, Flórez A, Montilla M, Pavía P, Nicholls R, Puerta C. Vigilancia de la enfermedad de Chagas congénita en Colombia. *Biomédica* 2011; 31(3):3-315. En: XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Simposio enfermedades parasitarias congénitas
39. Curto de Casas SI, Carcavallo RU, Galíndez IG, Jurberg J, Mena Segura CA. Geographical distribution and altitudinal dispersion of species of *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae, Triatomini). *Entomología y Vectores* 1996; 3 (2):43-58.
40. Depickère S, Buitrago R, Siñani E, Marianne Baune M, Monje M. Ronald Lopez2, Etienne Waleckx Tamara Chavez, Simone Frédérique Brenière. Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans*(Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new

- discoveries. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2012, 107(8): 1042-1047.
41. Elliot M. The pyrethroids: early discovery, recent advances and the future. Pestic. Sci 1989; 27:337-351.
 42. Estadíos de desarrollo en triatominos. En: <http://www.agroambiente.cl/plagas/vinchuca.php> 2010, consultado febrero 2013
 43. Estructura conformacional del fenitrotión En: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fenitrothion>, consultado Marzo de 2013
 44. 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.
 45. Ferreira N, Magalhães L, Fé F, Silvana Karina Arakian S, Wuelton Marcelo Monteiro W, das Graças M, Barbosa V. Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2009. 42(6):642-646.
 46. Ferrer E, DA Conceicao F, Campioli P, Lares M, López M, Rivera MG, Viettri M, Medina M, Salcedo M, Morocoima A, Herrera L. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas. Salus online, 12(1):163-174. En Ferrer E., Da Conceição F., Campioli P., Rivera M G, López M., Lares M., Medina M., Morocoima A., Herrera L. Estandarización de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de *Trypanosoma cruzi*. Memorias del VI Congreso de Investigación en la Universidad de Carabobo Valencia, Edo. Carabobo Venezuela. 2008, I: 532-536.
 47. Fontán A, González Audino P, Martínez A., Alzogaray R, Zerba E, Camps F. and Cork A. Attractant volátiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural bioassay. 2002. Journal of Medical Entomology, Vol 39(1): 191-197.
 48. Fontán A, González Audino P, Martínez A, Alzogaray R, Zerva E, Camps F, y Cork A. Attractants volátiles released by females and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural bioassay, Journal Medical of Entomology. 2002, 39(1):191-197.

49. Georghiou G, Lagunes A, Baker J. Effect of insecticide rotations on evolution of resistance. In: Miyamoto J, editor. IUPAC Pesticide Chemical, Human Welfare and the Environment 1983. Oxford:Pergamon. p 183-189.
50. Giraldo JD, Parra D, Pinel V, Vargas Y. Situación actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia, logros y perspectivas. Grupo de Investigación de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Medellín, 2008:1-33.
51. Gonzalez-Valdivieso F, Sanchez D y Nocerino F. Susceptibility of *R. prolixus* to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela. Un published document 1971, WHO/VBC/75 p.p.565.
52. Gualdrón L, Brocheros H, Arévalo C, Pérez L, Suárez M, Olano VA. Hallazgos de algunos vectores de la Enfermedad de Chagas en el departamento de Amazonas. Resúmenes XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Santa Fé de Bogotá, 1999; p.p.92.
53. Guhl F, Aguilera G. Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica epidemiológica de la fauna de Triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica 2007; 27. 143-162.
54. Guhl F, Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica y en Colombia. En Enfermedad de Chagas. Editada por: Rosas F, Vanegas D, Cabrales M. 2007 (1):1-219.
55. Guhl F, Angulo VM, Restrepo M, Nicholls S, Montoya R. Estado del arte de la enfermedad de Chagas en Colombia y estrategias de control. Biomédica, 2003; 23(1): 31-37.
56. Guhl F, Vallejo GA. Interruption of Chagas disease transmission in the Andean countries: Colombia, Mem. Ins. Oswaldo Cruz 1999; 94 (1):413-415.
57. Guía Gestión para la de vigilancia entomológica y control de la transmisión de la enfermedad de Chagas. Instituto Nacional de Salud. República de Colombia. Organización Panamericana de la Salud 2010, p.p. 1-96.
58. Herrera L, Urdaneta-Morales S, Carrasco H *Trypanosoma cruzi*: comportamiento de metratipomastigotes obtenidos de *Didelphis marsupialis* y *Panstrongylus geniculatus*. Rev Cient FCV-LUZ, 2003; 4:307-311.
59. IACUC (Institutional Animal Care and Use Committe) de la Universidad de Minnesota 2010. Consultado 18 Febrero 2013 <http://cflegacy.research.umn.edu/iacuc/>.
60. IDEAM. Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales. En: <http://institucional.ideam.gov.co/jsp/index.jsf>, consultado febrero de 2013.

61. Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook. 2nd. 2002.
62. Kakko I. Toxic Mechanism of Pyrethroids Studied in Vitro, 2004;p:1-55
63. International Society for Infectious Diseases 2009. http://www.promedmail.org/pls/otn/f?=&240:1202:73994917747902:NO:F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,76922.
64. LeOra-Software. POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA 2007.
65. Lee S and Scott J. Microsomal cytochrome P450 monooxygenases in the house fly. Biochemical changes associated with pyrethroid resistance and Phenobarbital induction. Pestic. Biochem. Physiol, 1989; 35: 1-10.
66. Lent y Jurberg. Observaciones sobre o ciclo evolutivo em laboratorio, do *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera:Reduviidae, Triatominae). Anales da Academia brasileira de Ciencias, 1969; 41: 125-131.
67. Lent y Widgonzinsky. Revision of triatominae (Hemiptera:Reduviidae) and their significance as vector of Chagas' disease. In Bull An MusNat Hist. 1979, p.p. 163-250.
68. Litchfield, J. y Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose/effect experiments. Pharmacol Exp. Ther, 1949; 96: 99-113.
69. Lugones H. Chagas aguda. Situación actual. 1st. Virtual Congress of Cardiology, Argentina. En Enfermedad de Chagas. Editada por: Rosas F, Vanegas D, Cabrales M. 2007 (1):1-219.
70. Maizels, R.; Blaxter, M.; Robertson, B. y Selkirk, M. Parasite antigens, parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology. Cambridge: University Press 1988.
71. Mayer M, Pifano CF, Medina R. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. XI Conferencia Sanitaria Panamericana. Cuadernos amarillos no. 30 Ed. Grafolit. Caracas 1946.
72. Miller S, Dykes D and Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. 1988 Nucleic Acids Research, 1988; 16(3):1
73. Milva J, Traviezo V, Rodríguez L, Perdomo R. Hallazgo de *Panstrongylus geniculatus* en urbanización de la zona este de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. REDVET- Revista electrónica de Veterinaria, 2012; 13 (2):1-10.

74. Ministerio de Salud de la Nación. Plan Nacional de gestión de plaguicidas de uso sanitario. Argentina 2005. Protocolo de evaluación de efecto insecticida y monitoreo de resistencia en *Triatoma infestans*.
75. Ministerio de Salud, Programa Nacional de Control de Enfermedad de Chagas, Informe Técnico a la VII Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa del Cono Sur, Buenos Aires Marzo 1998.
76. Molina-Garza Z, Rosales JL, GalaviZ L, Molina D, Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en Triatomínos silvestres de Nuevo León, México. Salud Pública de México, 2007; 49: 37-44.
77. Molina de Fernández D, Soto-Vivas A, Barazarte H. Susceptibilidad a insecticidas piretroides en cepas de campo de *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) de Venezuela. Entomotrópica, Boletín de Entomología Venezolana, 2004; 19(1): 1-5.
78. Molina J, Gualdrón L, Brochero H, Olano V, Barrios D, GUHL F.. Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatomínos (Reduviidae:Triatominae) en Colombia. Biomédica 2000; p.p.344-360
79. Moser D, Kirchhoff L, Donelson J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase chain Reaction. J. Clin Microbiol, 1989; 27:1477-82.
80. Motomura H and Narahashi Temperature dependence of pyrethroid modification of single sodium channel in rat hippocampal neurons. Membr Biol, 2000; 177: 23-39.
81. Narahashi T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. Pharmacol Toxicol 1996; 79:1-14
82. Naumann K. Synthetic pyrethroid insecticides. Chemistry of plant protection, 1990; Volumen 4. Springer Verlag, Berlin.
83. Neumann R. and Peter HH. Insecticidal organophosphate: nature made them first. Experientia 1987; 43:1235-1237
84. Nicholls R. Enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos: La experiencia en Colombia. Grupo de Parasitología Instituto Nacional de Salud, Colombia. In: Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA); Rio de Janeiro, 2006.

85. Niño EJ, Hernández LM, Ramírez AN, García C, Gualdrón L, Rodríguez LA, Angulo VM. Características epidemiológicas de brotes de Chagas Agudo en zonas de bajo riesgo en Santander, Colombia, *Biomédica*, 2009; 29, 338-339.
86. Noireau F, Flores R, Vargas F. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93:13-14.
87. OMS. Organizacao Mundial de Saude, Organizacao Pan-Americana da Saude. Vigilancia em Saúde e Gestao de Doencas. Projeto de Doencas Comunicaveis (PAHO/HSD/CD/530.09) Projeta de Saude Publica Veterinária (manuais técnicos Series, 12) “Guía para vigilancia, prevencao, controle e manejo clínico da DCA transmitida por alimentos” 2009.
88. OMS. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico. OMS/TDR/GTC/09. Organización Mundial de la Salud. Ginebra 2007.
89. OMS protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos [WHO protocol for the evaluation of insecticidal effect on triatomines.] *Acta Toxicológica Argentina*, 1994, 2:29–32
90. OMS: Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas Quinto informe de comité de expertos en biología de los vectores y lucha antivectorial, Ginebra 1980.
91. Oppernooth F J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In Kerkut, C. I. Gilbert [eds.], *Comprehensive e insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 1985;12:731-773.
92. OPS/OMS, VI Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Interrupción de la transmisión de la Enfermedad de Chagas, Santiago, Chile, Marzo 1997. Informe de progreso de Argentina
93. OPS. Enfermedad de Chagas. Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos 2009.
94. OPS. Quantitative estimation of Chagas disease in the Americas. OPS/HDM/CD/425-06:6. Washington, D.C. PAHO; 2006.
95. Paredes C, Bottazzi ME, Hotez P. The Unfinished Public Health Agenda of Chagas Disease in the Era of Globalization. *Plos neglected Tropical diseases*, 2009; 3(7):1-4.
96. Patterson JS, Barbosa SE, Feliciangeli MD. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiology significance. *Acta Trópica*, 2009; 110: 187-199.

97. Pavia P, Cuervo C, Montilla M, Nocholls S, Puerta C. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*. Asociación Colombiana de Infectología 2003; 13: 129-133.
98. Plan de desarrollo municipal “Capitanejo para retomar el camino” Alcaldía municipal de Capitanejo, 2008-2011; p.p. 1-117.
99. Plazas M y Olarte F. Intoxicación por inhibidores de la colinesterasa (organofosforados y carbamatos) en niños y adolescentes: revisión de la literatura y guía de manejo. Acta Colombiana de Cuidado Intensivo 2011; 11(1): 26-33.
100. Pereira KS, Schmid FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas disease a foodborne illness, J food Prot, 2009; 72:441-446.
101. Picollo MI, Vassena CV, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M and Zerba EN. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. J Med Entomol, 2005; 42: 637-642.
102. Publicación INCAP MDE-025. Plaguicidas de tipo organofosforado y carbamatos. INCAP-ECO-UNED.
103. Rassi Jr A, Rassi A, Maruondes J. American Trypanosomiasis (Chagas disease). Infectious disease clinics of North América, 2012; 26(2):275-291.
104. Rassi A Jr., Rassis A, Marín JA. Chagas disease. Lancet, 2010; 375:1388-1402.
105. Raymond M. Presentation d’un programme d’analyse log probit pour micro-ordinateur. Cah Orstom Ser. Entomol Med Parasitol, 1985; 22:117-121.
106. Reyes-Lugo M. ¿Qué ha pasado en Venezuela cuando el ambiente urbano invade el hábitat natural de los triatominos vectores de la Enfermedad de Chagas? Academia Biomédica Digital. VITAE, 2011:1-8.
107. Reyes Lugo M. Bioecología de *Panstrongylus geniculatus*, vector de la enfermedad de Chagas en el centro-norte de Venezuela. Tribuna del investigador. 2010; 11 (1-2):30-31
108. Reyes-Lugo M. *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela. Rev Biomed, 2009; 20:180-205.

109. Reyes-Lugo M. Phothotropic behavior of the Chagas disease vector of *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae) under laboratory conditions. En: M Savopoulou-Soultani, Phloannidis, Editors. Proceedings of VII European Congress of Entomology. Hellenic Entomological Society. Thessaloniki, 2002:264.
110. Reyes-Lugo M, Rodriguez-Acosta A. Domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000; 94:508.
111. Reyes-Lugo M. ¿Realmente el chipo *Panstrongylus geniculatus* tiene poca importancia como transmisor de la enfermedad de Chagas en Venezuela? *Arch Venez Med Trop*, 1999; 3(1): 3-4.
112. Reyes Jerez M, Angulo VM. Ciclo de vida de *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811 (Hemiptera, Reduviidae) en condiciones de laboratorio: producción de ninfas para ensayos biológicos. *Biomédica*, 2009; 29 (1).
113. Reyes Jerez M, Angulo VM, Sandoval C. Efecto tóxico de B-cipermetrina, Deltametrina y Fenitrothion en cepas de *Triatoma dimidiata* y *Triatoma maculata* (Hemíptera-Reduviidae). *Biomédica*, 2007; 27:75-82.
114. Robertson and Preisler Pesticide bioassays with arthropods, 1992. CRC, Boca Raton
115. Robertson J, Russell R, Preissler H, Savin N. Biossays with arthropods. Second edition. CRC press 2007; p.p:1-224
116. Robertson J, Russell R, Savin N. POLO: a user's guide to Probit Or LOGit analysis. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, 1980; p.p. 1-78.
117. Rocha G, Biral C, Falqueto A. Insecta, Hemiptera, Reduviidae, *Panstrongylusgeniculatus*: Geographic distribution map. *Check List* 2007: 3(2)
118. Rodríguez-Bonfate C, Amaro A, García M, Mejías Wholert LE, Guillén P, García A. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela; infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad Saúde Pública*, 2007; 23 (5): 10-18.
119. Rodríguez MM. Estudio de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" 2008: 1-121.

120. Rojas de Arias MA. Nuevas estrategias de vigilancia entomológica para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas. 2005.
121. Ruigt, G.S.F. Pyrethroids in comprehensive. Insec Physio. Bioch and Pharmacol. Ed. G. A. Kerkut, L.I. Gilbert, Oxford, UK. Pergamon, 1985; 12:183-262.
122. Sammartino M, 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. Rev. Soc. Entomol. Argent, 2009; 68 (3-4): 243-252.
123. Sanchez JF. Informe comportamiento del Programa de Chagas, Cundinamarca, años 2002-2005. Secretaria de salud de Cundinamarca. En Guhl F, Editor. Primer Taller Internacional sobre el Control de la Enfermedad de Chagas. VI Reunión de iniciativa Andina para el control de la enfermedad de Chagas. Bogotá DC.: Ediciones Uniandes, 2005: 135-140.
124. Santo Orihuela, Pablo Luis, Picollo MA. Contribution of general esterases to pyrethroid resistant *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) from Argentina and Bolivia. Acta toxicológica de Argentina, 2011; 19 (1): 32-40.
125. Santo Orihuela, P. VASSENA C, ZERBA EN, and PICOLLO MI. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J. Med. Entomol, 2008; 45:298-306.
126. Santo Orihuela, Gonzalo Roca Acevedo, Gastón Mougabure Cueto, Germano M, Santo Orihuela P, ROJAS M, CORTEZ M, NOIREAU F, PICOLLO MI, and VASSENA C. Susceptibility of Sylvatic *Triatoma infestans* from Andean Valleys of Bolivia to Deltamethrin and Fipronil. Journal of Medical Entomology, 2008:828-835.
127. Saume F. Introducción a la química y toxicología de insecticidas. Maracay: Industria Gráfica Integral C.A, 199; p.p.212.
128. Scharf M. Neurological Effects of Insecticides. Encyclopedia of Pest Management, 2003; p.p.1-5
129. Schenone H Jr, González H, Schenone H, Rojas A. Infección experimental de ratas con *Trypanosoma cruzi* por vía oral. Bol Chile Parasit, 1982; 37: 2-9.
130. Schofield, C. Triatominae. Biología y control. Eurocomunica Publications, UK 1994.
131. Shannon RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. Am J Trop Med. 1939, 19:131-138.

132. Silveira A. Factores de riesgo implicado en la transmisión oral de la Enfermedad de Chagas. In: Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA); Rio de Janeiro, 2006: 16-19.
133. Soto Vivas A, Molina de Fernández D. Toxicidad de cinco insecticidas en una cepa de laboratorio de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) de Venezuela. *Entomotropica*, 2001; 16(3): 187-190.
134. Soto A. Diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Memoria para optar a título profesional de Médico Veterinario. Universidad de Chile. Santiago, 1998:59.
135. Spiro Thomas G, Stigliani William M., Química Medioambiental, Segunda Edición. Pearson Educación S.A. Madrid, 2004: 399-401. En Boletín Electrónico Informativo sobre productos y residuos químicos
136. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al., Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008; 60: 25-32.
137. Stenersen, J. Chemical pesticides. CRC Press, Boca Raton, 2004.
138. Storino, R., M. Jörg y Auger S. Atención médica del paciente chagásico. Manual práctico. Un enfoque biológico, antropológico y social. Ed. Ediprof, 2003.
139. SUCEN – Superintendência de controle de endemias. Classificação de inseticidas. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/download/segtrb/sequi2.pdf> >. Acessado em 20 de Junho de 2010.
140. Torres-Vila L, Rodríguez M.-Molina, Alfredo Lacasa M.-Plasencia, Bielza-Lino P, Rodríguez-del-Rincón A. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: current status and agroecological perspective
141. [TDR] .Tropical Disease Research. 2002. Chagas disease. Strategic direction for research. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>
142. Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile*, 2011; 139: 258-266

143. Valente SA, Valente VC, Pinto A. Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazonia Brasileira. Instituto Evandro Chagas. Rodovia. In: Informe Final Consulta Técnica y Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA); Rio de Janeiro, 2006; p.p. 21-26.
144. Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*: vector-parasite interactions. Acta Trópica. 2009; 110:137-47.
145. Vassena C y Picollo MI. Monitoreo de la resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. Revista de toxicología en línea, 2003; p.p. 1-21.
146. Vassena C, Picollo MI and Zerva E. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Med. Vet. Entomol, 2000; 14: 51-55.
147. Vera CV, Valente SA, Noireau F, Carrasco H, Miles M. Chagas disease in the Amazonian basin: Association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera:Reduviidae) with domestic pigs. Journal of medical entomology.1998; 35(2):99-103
148. Villacis A., Arcos L, Grijalva M. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions Mem Inst Oswaldo Cruz, 2008; 103(7):690-695.
149. WHO. World Health Organization Technical. Infectious disease home. Specific information: disease, 2004.
150. WHO. World Health Organization Technical. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva, 2002.
151. WHO. World Health Organization Technical. Report series No. 818 (Vector Resistance to Pesticides), 1992.
152. WHO. World Health Organization Technical Seventh report Expert Committee on insecticides. WHO Tech Report Ser, 1957; 125:37.
153. Wolff M, Castillo D. Evidencias de domesticación y aspectos biológicos de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1881) (Hemiptera: Reduviidae). Acta Entomol Chilena, 2000; 24:77-83.

154. Wolff M, y González C. Ciclo de vida de *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones de laboratorio. *Caldasia*, 1998; 20 (1):75-77.
155. Zambrano P, Cucunubá Z, Montilla M, Flórez A, Parra E, Ramirez A, Echeverría L, Puerta C, Cortes L, Pavía P, Chaves J, Ayala M, , Duque S, Nicholls S. Brotes de Síndrome Febril Asociado a Miocarditis Aguda Chagásica de Posible Transmisión Oral en el Departamento de Santander, Colombia, diciembre de 2008 a mayo de 2009. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional IQEN ISSN: 0122-9907, 2010; 15:17 – 26.
156. Zeledón R. Epidemiology, modes of transmisión and reservoir hosts of Chagas' disease. In Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. In Ciba Found. Symp. 20 (New Series), Elsevier Excerpta Medica, North Holland. 1974.
157. Zerba, EN. Past and present of Chagas vectors control and future needs. Position paper. World Health Organization, Geneva, 1999.
158. Zerba EN. Evolución del control químico de los insectos vectores de la enfermedad de Chagas. *Anales de la sociedad científica Argentina*, 1997; 227:35-49.
159. Zerba, EN.; Licastro SA, de; Word, E, Picollo, MI. Insecticidas: Mechanism of action. In: Brenner, R.; and Stoka, A. (Eds.). Chagas disease vectors, vol. III. CRC Press, 1987. Boca Raton
160. Zulantay I, Werner A, Ortiz S, Araya E, Rodriguez J, Corral G. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con nifurtimox en pacientes crónicos: evaluación parasitológica de la eficacia terapéutica, resultados preliminares. *Biomédica* 2011;31(3):3-315