



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO DE LA TESIS

DINÁMICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN
COMUNIDADES RURALES DEL SUR DEL ESTADO DE
PUEBLA

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

IVÁN EPIFANIO BRAVO RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CÉSAR ANTONIO SANDOVAL RUIZ

CODIRECTOR:

DR. JOSÉ LINO ZUMAQUERO RÍOS



Febrero, 2018.

CONTENIDO GENERAL

- ÍNDICE
- RESUMEN
- INTRODUCCIÓN
- HIPÓTESIS
- OBJETIVOS
- MÉTODOS
- RESULTADOS
- DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES
- BIBLIOGRAFÍA
- ANEXO

Resumen

La Enfermedad de Chagas (EC), es una zoonosis ocasionada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* que se transmite principalmente vía vectorial mediante heces de chinches hematófagas infectadas (Triatominae) y afecta principalmente a las comunidades más pobres de América Latina. En este trabajo se da conocer la dinámica de la EC en tres comunidades rurales (Rancho la Sandía, La Noria Chica y San Miguel) de Acatlán de Osorio en el sur del estado de Puebla bajo los enfoques entomológico, molecular y epidemiológico. El trabajo de campo se llevó a cabo durante tres temporadas climáticas (seca-fría, seca-cálida y lluvias). El objetivo del enfoque entomológico fue conocer los factores de riesgo ante la infestación domiciliaria por triatominos, mediante un árbol de clasificación se analizaron 26 variables de una encuesta socioeconómica y entomológica sobre las condiciones de las viviendas y se aplicó un modelo lineal generalizado (MLG) para obtener la variación explicada por cada factor. Los factores más importantes que arrojó el análisis fueron la localidad, el número de ovinos, el uso de insecticidas y el número de habitaciones de las viviendas. Se analizaron deyecciones de triatominos (*Meccus pallidipennis*) colectados en la zona de estudio para identificar sus fuentes de alimentación por ensayo Heterodúplex acoplado a PCR, siendo el humano la fuente sanguínea más común. Mediante ensayos ELISA (Chagatest) se detectaron anticuerpos (Acs) anti *T. cruzi* en 3 de 50 sueros examinados (seroprevalencia del 6%). Los índices entomológicos fueron: infestación 75%, colonización 48.1%, hacinamiento 5.5, densidad 4.1. El índice de infección natural con *T. cruzi* (IIN) total fue de 40.2%, sin embargo, la localidad Rancho la Sandía tuvo un IIN de 56.7%, más alto que las otras dos localidades ($p=0.001$), asimismo esta localidad presentó la infestación más alta (91.6%). Hubo diferencias significativas en el IIN entre temporadas con el valor más alto en seca-fría (51.2%, $p=0.001$). El alto porcentaje de IIN de los triatominos asociado a sus fuentes de alimentación y a los factores de riesgo que propician la infestación domiciliaria determinados en esta investigación, revelan la importancia de analizar distintos enfoques y elementos que intervienen en la dinámica de la transmisión del parásito al hombre para diseñar estrategias de control vectorial eficaces y combatir la EC que afecta a la población más vulnerable.

Introducción

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana es una condición incapacitante ocasionada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Con mayor relevancia en América Latina está catalogada dentro de las enfermedades tropicales desatendidas que afectan a la población más pobre del mundo (Hotez et. al. 2007). La Organización Mundial de la Salud estima que existe una prevalencia de entre 6 y 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* y cerca de 100 millones de personas están en riesgo permanente. De los pacientes crónicos aproximadamente un 30% presentan alteraciones cardíacas y un 10% padecen alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas (OMS, 2016). Así mismo, la Organización Panamericana de la Salud indica que se presentan 56,000 nuevos casos anuales motivando una tasa de mortalidad de aproximadamente 12,000 personas al año, la mayoría de 21 países latinoamericanos (OPS, 2016). No obstante, la enfermedad ha cobrado relevancia en regiones no endémicas como zonas urbanas de Europa, Estados Unidos y Canadá, debido a las migraciones humanas en los últimos 100 años (Rodríguez & Gorla, 2004).

La EC se extiende en toda la República Mexicana (NOM 032) con una prevalencia de 1 768 376 personas infectadas con *T. cruzi* y una población de 71 120 043 está en riesgo constante. Ocho estados del país (Chiapas, Veracruz, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, México, Oaxaca y Puebla) concentran más del 69% de los casos seropositivos. Además, se estima que cada año 830 niños menores de 15 años mueren de falla cardíaca o meningoencefalitis por la EC en su fase aguda, y más del 59% de esa mortalidad ocurre en poblaciones rurales (Ramsey et. al. 2003).

El parásito se puede transmitir mediante transfusión sanguínea (3.9%), contaminación congénita (0.1%) y en menor grado por trasplante de órganos e incluso por accidentes en laboratorio, sin embargo, en México, más del 96% de los casos se da por transmisión vía vectorial (Ramsey et. al. 2003) a través de heces de chinches hematófagas (Reduviidae: Triatominae) infectadas con *T. cruzi*, que habitan ambientes silvestres asociados a sus hospederos vertebrados, como nidos

de aves, refugio de zarigüeyas, pilas de rocas, árboles huecos, madrigueras de roedores, cuevas de murciélagos, entre otros. No obstante, los vectores tienden a adaptarse eficazmente a viviendas humanas y han colonizado ecotopos peridomésticos tales como gallineros, corrales de ovicaprinos, e incluso algunas especies han realizado la transición al intradomicilio (Patterson, 2001), esto adquiere gran interés en salud pública, debido a que en los países latinoamericanos las zonas de riesgo se ubican en áreas rurales cuyas condiciones socioeconómicas son precarias y además están asociadas a triatominos de acentuada característica antropofílica (Aldana, et. al. 2011).

Para México se han descrito 31 especies de triatominos y la mayoría se han reportado infectadas naturalmente con *T. cruzi* (Ramsey, et. al. 2015). Los vectores adquieren al parásito alimentándose de reservorios silvestres infectados, que representan un sistema que incluye una o más especies de mamíferos que juegan un papel importante y diferente en el mantenimiento del ciclo zoonótico de la enfermedad con cierta escala espaciotemporal en distintas regiones (Jansen & Rodrigues-Roque, 2010). Técnicas moleculares como la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) pueden ser aplicadas para detectar al parásito en la sangre de los reservorios, incluso modificaciones a tales técnicas, se pueden implementar para identificar qué especies animales representan las fuentes sanguíneas de los vectores, como el ensayo Heterodúplex acoplado a PCR que usa el gen de citocromo b, y muestra patrones en electroforesis que corresponden a especies de mamíferos, potenciales recursos sanguíneos de los triatominos (Bosseno, et. al. 2006).

El estado de Puebla es considerado como una región no endémica para la EC, debido a la escasa investigación y falta de notificación de casos crónicos, sin embargo, un estudio sobre la prevalencia de anticuerpos (Acs) anti *T. cruzi*, reportó a 37 seropositivos de 2489 donadores de sangre, registrando una prevalencia de 1.4%, resaltando la mixteca baja como la región con la prevalencia (2.6%) más alta del estado (Monteón, et. al. 2005). Esto concuerda con una prevalencia de 4.3% registrada para el municipio de Palmar de Bravo de la misma región, que está

asociada a vectores como *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*, donde los factores determinantes para ser seropositivo a *T. cruzi* están relacionados con las condiciones precarias de la población (Sosa-Jurado, et. al. 2004).

En la mixteca baja poblana la mayoría de la población vive en ambientes rurales con grados de marginación muy altos, en el municipio de Acatlán de Osorio el 73% de los habitantes vive en pobreza (Sedesol, 2015). Así mismo 11,347 personas (35%) no tienen acceso a servicios de salud, el 80% no cuentan con seguridad social, el 23% de las personas habitan en viviendas construidas con materiales de mala calidad y espacio insuficiente, además el 65% de las viviendas no dispone de los servicios básicos lo que significa que las condiciones de vivienda no son adecuadas para más de 21,100 personas de este municipio (CONEVAL, 2010).

Estas características socioeconómicas sumadas a las condiciones ecológicas de la región, al cambio de uso de suelo y al efecto cascada causado por este proceso, representan escenarios potenciales de riesgo de adquirir la enfermedad por transmisión vectorial, así mismo la colecta de *M. pallidipennis* en biotopos intra y peridomiciliarios soportan la hipótesis de que las áreas más cálidas y secas producen las condiciones ecológicas idóneas para la presencia de este vector en la mixteca baja poblana (Sandoval-Ruiz, et. al. 2008). El conocimiento de los factores de riesgo ante la infestación domiciliar por triatominos, la distribución conocida y potencial de los mismos generados por modelado de nicho ecológico (Ramsey et. al. 2003), la determinación de las fuentes de alimentación de los vectores, así como la ecología de sus poblaciones, es información fundamental para el diseño y selección de estrategias de vigilancia y control vectorial con el fin de reducir el riesgo de infección con *T. cruzi* en habitantes de comunidades rurales con características socioeconómicas precarias y grados de marginación altos que representan la población más vulnerable.

Hipótesis

- Existen condiciones ecológicas y socioeconómicas en las localidades de estudio que generan sitios adecuados para la crianza y reproducción de triatomíneos en biotopos domésticos, los animales de estos biotopos representan las principales fuentes de alimentación de los vectores y existe presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en los habitantes de la región.

Objetivos

General

Conocer la dinámica de la Enfermedad de Chagas en comunidades rurales de Acatlán de Osorio, en la Mixteca Baja Poblana bajo los enfoques entomológico, molecular y epidemiológico.

Específicos

Analizar la colecta de triatominos por participación comunitaria así como el Índice de infección natural con *T. cruzi* entre temporadas climáticas de muestreo (Seca-Fría, Seca-Cálida y Lluvias) y entre localidades.

Obtener los índices entomológicos de la enfermedad de Chagas para conocer el grado de domiciliación de los triatominos.

Determinar los principales factores de riesgo que propician la infestación domiciliaria por triatominos en viviendas rurales.

Identificar las principales fuentes de alimentación de los vectores a través de un ensayo Heterodúplex acoplado a PCR (HDA-PCR).

Detectar anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en habitantes de la zona de estudio mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Métodos

Área de estudio

El trabajo de campo se realizó en tres localidades rurales (Rancho La Sandía, La Noria Chica y San Miguel) del municipio de Acatlán de Osorio ($18^{\circ}12' N$, $98^{\circ}09' O$), ubicado en la Sierra Mixteca Baja al sur del estado de Puebla dentro de la región hidrológica de la depresión del Balsas (Fig. 1). La zona de estudio se encuentra a una altitud aproximada de 1300-1400 msnm, su topografía típica de relieve accidentado está representada por sierra volcánica de laderas escarpadas (68%), de sierra compleja (19%) y de lomerío con cañadas (11%), presenta una temperatura media anual que oscila entre $18-26^{\circ}C$, el rango de precipitación anual está entre los 700-900 mm, la región presenta un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano (52%), semiseco muy cálido y cálido (27%) y semicálido subhúmedo con lluvias en verano (21%), su vegetación está representada principalmente por la selva baja caducifolia (58%), y pastizal (8%). El uso de suelo es principalmente agrícola (25.5%) y de zona urbana (2%) (INEGI, 2009), las tres localidades presentan un alto grado de marginación (SEDESOL, 2015).

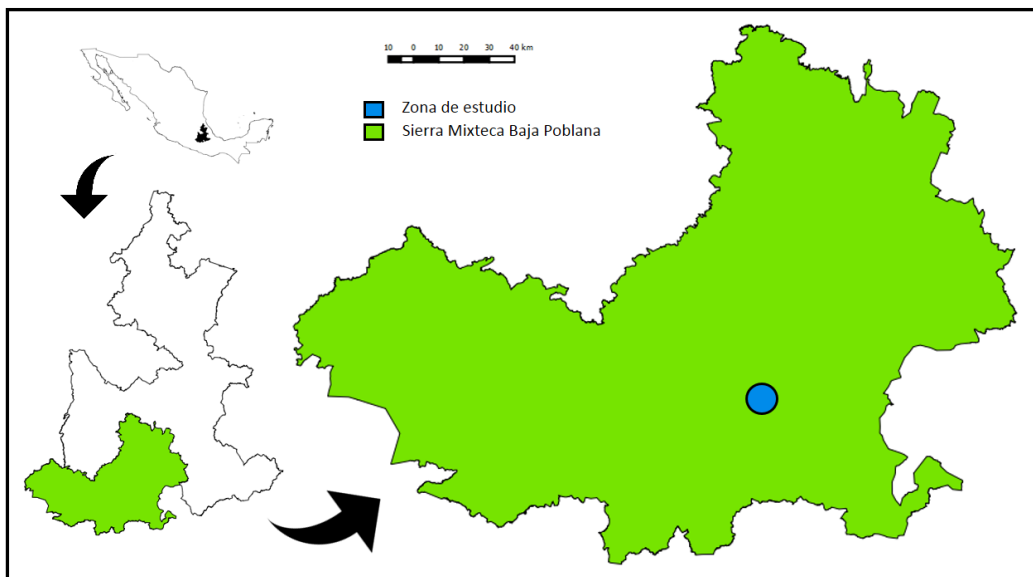


Figura 1. Ubicación de la Zona de estudio en la Sierra Mixteca Baja del sur del Estado de Puebla.

La elección de la zona de estudio se determinó con base al antecedente de colecta del vector, a las características típicas del ambiente rural, donde las modificaciones antropogénicas, tales como casas abandonadas, corrales para el ganado, pilas de rocas, cúmulos de leña, entre otras, propician hábitats idóneos para la sobrevivencia de los vectores, y debido a la falta de estudio entomológico en la región.

Diseño de Muestreo

Se realizaron colectas del vector en las tres localidades durante 6 meses de muestreo (febrero-julio de 2017), considerando tres temporadas climáticas (seca-fría, seca-cálida y lluvias). Con base en la metodología recomendada por el Comité experto sobre la Enfermedad de Chagas de la OMS (WHO, 1991), se inspeccionaron hogares, donde se concedió el permiso, con un tiempo de búsqueda de 1 hora/hombre en cada vivienda, con ayuda de pinzas de 30 cm de largo, guantes de látex y lámpara de cabeza. En el área intradomiciliar, se revisaron los espacios detrás de los muebles, grietas de las paredes de todas las habitaciones, debajo de camas, detrás de cuadros, acumulaciones de leña en cocinas, mientras que en el peridomicilio, se revisaron todos los refugios posibles del vector, tales como corrales de ganado, pilas de rocas, leña, ramadas, el área de jardín, bodegas de almacenamiento de productos agrícolas, construcciones abandonadas o sin uso, sitios de descanso de los animales domésticos y el resto del espacio peridomiciliar.

Por otro lado, se contó con la participación de la comunidad, quienes colectaron de manera pasiva chinches que llegasen a encontrar en sus viviendas (Aché & Berti, 1995). Para ello, con permiso de las autoridades, se realizó una plática informativa sobre la enfermedad de Chagas ante los habitantes de las localidades, previo al inicio del muestreo, donde se habló sobre el agente causal, el vector y el huésped, haciendo hincapié en el riesgo latente de adquirir la enfermedad vía vectorial. Se entregaron frascos a las personas que estaban dispuestas a colaborar con el proyecto de investigación. Posteriormente, se realizaron visitas (12) al sitio cada dos semanas para recoger triatominos colectados por este método durante todo el tiempo de muestreo siguiendo una ruta que permitiera visitar de manera efectiva

todas las viviendas. Adicionalmente se colectaron chinches silvestres por participación comunitaria y por búsqueda.

Todas las chinches se colectaron en frascos de plástico, con papel cartoncillo negro en su interior a manera de acordeón para evitar estrés del vector. A la tapa se le hicieron agujeros de tamaño adecuado para que la chinche se ventile, pero que impidiera la fuga de los huevecillos que pudiesen ovipositar las hembras. Se tomaron los datos de colecta y se hizo una descripción del hábitat donde se encontraron, intradomicilio o peridomicilio. Los organismos colectados se etiquetaron y montaron en alfiler entomológico y se resguardaron en la colección entomológica del laboratorio de Artropodología y Salud de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla como material de evidencia. La determinación taxonómica se hizo usando las claves de identificación para las especies de triatominos del complejo "*phyllosoma*" de Alexandre-Aguilar, et. al. (1999) y de triatominos de Lent y Wygozinsky (1979).

Índices entomológicos

Se calcularon los indicadores entomológicos para la enfermedad de Chagas sugeridos por Silveira et. al. (1984) y recomendados por la "Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector", para establecer el grado de domiciliación de los vectores y entender su papel en la transmisión local de la enfermedad. Los índices calculados fueron: infestación (IIF), hacinamiento (IHA), densidad (IDE), colonización (ICO) e infección natural con *T. cruzi* (IIN) (Anexo 1).

Encuesta sobre factores de riesgo ante la infestación por triatominos

Se aplicó una encuesta socioeconómica y entomológica (Anexo 2) a los habitantes de la comunidad que concedieron permiso para la búsqueda domiciliaria de triatominos y que mostraron disposición para participar en la colecta cuyas variables describían las características estructurales de las viviendas, la presencia de animales domésticos y de ganadería, así como algunos hábitos de los residentes

del hogar, para identificar los principales factores de riesgo ante la infestación de la vivienda humana por triatominos en la mixteca baja poblana (Dumonteil et. al. 2013 y Sandoval-Ruiz et. al. 2014).

Índice de infección natural con *Trypanosoma cruzi*

Para calcular en índice de infección natural con *T. cruzi*, los triatominos fueron trasladados al laboratorio de Parasitología y Vectores de la Facultad de Ciencias Biológicas-BUAP, donde se alimentaron con sangre de conejo por aproximadamente 30 minutos por chinche para que la ampolla rectal se dilatara provocando la deyección y analizar inmediatamente el material fecal en portaobjetos con solución salina (PBS 1X, pH=7.4) para detectar por observación directa al microscopio (ODM) el parásito, utilizando un microscopio óptico a 40x (Zeiss). Se consideraron dos tipos de positivos, por un lado a aquellos triatominos que presentasen tripomastigotes metacíclicos (forma flagelada) en la preparación y por otro a aquellos que presentaran además formas microesféricas del parásito. Las deyecciones se depositaron en tubos de 1.5 ml con PBS al 25% para identificar mediante PCR a *T. cruzi* y determinar los recursos sanguíneos del vector.

Fuentes de Alimentación

Las deyecciones colectadas previamente en tubos con PBS 1X se trasladaron al laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana campus Orizaba, Veracruz, para realizar la extracción y purificación de ADN y emplearlo para la identificación de las principales fuentes de alimentación de los vectores mediante la técnica de Heterodúplex acoplado a PCR (HDA-PCR) de acuerdo al método descrito por Lee et al. (2002) y Bosseno et al. (2006). Para ello se siguieron los siguientes tres procedimientos:

a) Extracción de ADN del vector

Se vertieron 200 µl de heces en un tubo de 1.5 ml adicionado 400 µl de Buffer ACK (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 1 mM, EDTA 0.1 mM) y se incubó durante 20 minutos a

temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 1,500 rpm (MIKRO 22 R Hettich) por 10 minutos y se removió el sobrenadante con ayuda de una micropipeta (depositándolo en cloro al 10 %). La pastilla se resuspendió en 125 µl de Buffer SE (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, pH=8); adicionando 1 µl de Proteinasa K (20 mg/mL) y 6 µl de SDS al 10 %, esta mezcla se sometió a vórtex durante 1 minuto y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se agregó 125 µl de Buffer SE y 250 µl de fenol sometiendo a vórtex por 1 minuto y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo añadiendo 250 µl de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se sometió a vórtex por 1 minuto y se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a un nuevo tubo y se añadió 250 µl de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se sometió a vórtex por 1 minuto y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 2X de isopropanol. Se dejó la muestra en precipitación toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se desechó con una micropipeta y la pastilla se lavó con 500 µl de Etanol al 70%, centrifugando a 12,000 rpm durante 5 minutos, el alcohol se decantó en cloro al 10%, se colocó el tubo sobre un papel absorbente para eliminar los restos de alcohol por 10-15 minutos. Finalmente, el ADN se resuspendió en 20 µl de agua desionizada (H₂O Milli-Q) y se refrigeró a -20°C hasta su uso posterior. Los reactivos usados se muestran en el Anexo 3.

b) PCR de ADN extraído

Se realizó una PCR para la amplificación de fragmentos específicos de citocromo b, utilizando para la reacción los siguientes reactivos: 10 pmol de cada oligonucleótido (primers): ctb-1 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' y ctb-2 5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' (Bosseno et al., 2006), Buffer 10X (concentración final 1X) de 20 mM de Tris-HCl (pH=7.2), MgCl₂ 50 mM (concentración final de 1.5mM), dNTP's (dinucleótidos trifosfatados) 2.5 mM (concentración final 0.1mM), una unidad de enzima Taq polimerasa (Perkin-Elmer), y una unidad de ADN problema, para un volumen total de reacción de 25 µl (Anexo

4). La reacción se llevó a cabo en un termociclador de gradiente de concentración (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C de 5 minutos, 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C por 30 segundos, seguido de una hibridación (alineamiento) a 55°C por 30 segundos y una extensión (elongación) a 72°C por 30 segundos. Terminados los ciclos, se finalizó con una elongación a 72°C por 10 minutos. Se utilizó como control ADN de cerdo.

Los productos de reacción de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8%, utilizando como amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH=8.3), cargando 5 µl de ADN muestra acompañado de 1 µl de Buffer de Muestra Tipo III para ADN visualizados (Fig. 2) mediante la tinción con bromuro de etidio (BIO-RAD) a una concentración final de 0.5µg/ml en un transiluminador en presencia de luz UV (Benchtop UV Transilluminator, UVP PhotoDoc-It, Imaging System).

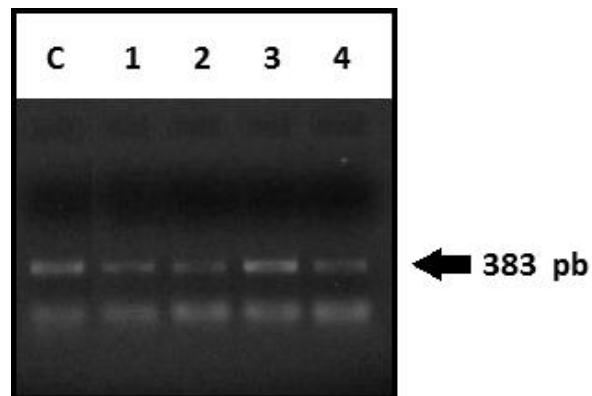


Figura 2. Amplificados de citocromo b empleando ADN a partir de heces de vectores. C= Control positivo empleando ADN de cerdo, carriles 1, 2, 3 y 4 correspondientes a muestras de los vectores.

c) Heterodúplex de los productos amplificados de PCR

Los Heterodúplex se generaron mediante el método descrito por Lee et al., 2002; Bosseno et al., 2006. Se homogenizaron 12 µl de cada producto de PCR que amplificó citocromo b (ADN problema) con 12 µl de amplificado de citocromo b de cerdo (ADN guía/driver) en tubos de 600 µl, a la mezcla (1:1) se adicionó 50 µl de

aceite mineral y se sometió a desnaturalización a 95°C por 2.5 minutos en un baño con recirculación automática (Cole-Parmer), posterior a ella, los tubos se colocaron en hielo por 15 minutos para facilitar la formación de los Heterodúplex, una vez limpio de aceite mineral, los Heterodúplex generados se cargaron acompañados de 4 µl de Buffer Muestra DNA 6X, en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de urea. Empleando amortiguador TBE 1X (Tris-HCl, ácido bórico y EDTA) a un voltaje de 100 volts/20 mA (BIO-RAD) por un intervalo de 90 minutos. Posteriormente el gel fue teñido con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) durante 20 minutos y se observó en un transiluminador de luz UV (Benchtop UV Transilluminator).

Detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* (ELISA)

A través de cartas de consentimiento informado y explicando el objetivo del trabajo de investigación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en la zona de estudio, se colectaron muestras sanguíneas en tubos vacutainer de personas mayores a 8 años, con el objetivo de detectar anticuerpos (Acs) anti *Trypanosoma cruzi* en la población, mediante ensayos inmunoenzimáticos ELISA (Chagatest ELISA recombinante v. 4.0, Anexo 7). Chagatest es un ensayo inmunoenzimático in vitro para la detección cualitativa de Acs anti *T. cruzi* en muestras de suero humano. La muestra se diluye en la policubeta cuyos pocillos se encuentran sensibilizados con seis antígenos recombinantes (SAPA, 1, 2, 13, 30 y 36) específicos de los estadios epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas (Wiener Laboratorios, 2000). Se utilizó un antígeno crudo del parásito de procedencia casera obtenido en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular (LADISER-FCQ-UV) con la finalidad de confirmar los casos seropositivos (Guzmán et al 2015).

Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos para obtener el suero y se conservaron a -20°C hasta su uso. Se colocaron 100 ul de diluyente para muestra 1x (25x en concentración inicial) en las policubetas de la placa (pocillos) para 50 sueros. Se utilizaron dos pocillos para el control positivo, colocando 20 ul de C+ recombinando con 80 ul del diluyente en cada pocillo con ayuda de una micropipeta. Para el control negativo se utilizaron igualmente dos pocillos con 20 ul de C-

agregando 80 ul de diluyente y se recombino con micropipeta. Se colocó 20 ul de suero problema para 52 pocillos muestra, y se recombino con micropipeta. Se selló la placa con tiras autoadhesivas para impedir la evaporación de los reactivos. La placa se incubó a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos. Posteriormente se volcó la placa para eliminar el contenido, después se realizaron 5 lavados con 300 ul de solución de lavado 1x (con 30 segundos de intervalo por lavado). Después del lavado, se verificó que no quedaran burbujas ni líquido en los pocillos. A continuación, se agregó 100 ul del conjugado a cada pocillo cubriendo con las tiras adhesivas y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se volcó la placa para eliminar el contenido y se lavó 5 veces con 300 ul de solución de lavado. Una vez lavado, se agregó 100 ul de sustrato a cada pocillo cubriendo con las tiras adhesivas incubando la placa en oscuridad por 30 minutos. Se detuvo la reacción añadiendo 100 ul de solución Stop en cada pocillo. La lectura de la placa se realizó en un espectrofotómetro a 450 nm. La presencia/ausencia de anticuerpos anti *T. cruzi* se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del Cut-off (valor de corte). Cut-off es igual al promedio de las densidades ópticas del control negativo más 0,200. Se consideran muestras reactivas positivas aquellas con absorbancia mayores o iguales al Cut-off.

Análisis estadístico

Para conocer los factores de riesgo que propician la infestación domiciliar por triatominos, se realizó un análisis descriptivo (mediante un árbol de clasificación), de las variables de la encuesta aplicada a los habitantes, para explorar su relación con la presencia de triatominos en las viviendas humanas. El análisis de árbol de clasificación, explica la variación de la variable respuesta (dependiente) a través de divisiones repetidas de los datos dentro de grupos más homogéneos, usando combinaciones de las variables explicativas (independientes) que pueden ser categóricas o numéricas y se pueden usar para la descripción y predicción de patrones o sucesos. De un rango de alternativas posibles (modelos probables), el algoritmo selecciona el modelo con el error de predicción más bajo. El árbol de clasificación inicia con la partición o división (splits) de los datos en nodos lo más

homogéneos posibles, después se repite el proceso de división hasta clasificar las observaciones. La variable que se introduce en un nodo es la que minimiza la heterogeneidad que resulta de la división de los datos (De´Ath & Fabricius, 2000).

A partir de la base de datos sobre las variables de la encuesta aplicada, se modeló un árbol de clasificación para la exploración inicial de los datos y responder a la pregunta de qué viviendas tienen alta probabilidad de estar en riesgo de infestación dependiendo de los factores que el algoritmo considerara los más adecuados para hacer lo cortes (splits) y formar los nodos para explicar la presencia de triatominos en dichas viviendas. El análisis consistió en reconstruir un árbol consenso con el error de predicción más bajo a partir de varios árboles estimados. Se utilizó la función “tree” para generar el árbol de clasificación (library “tree”).

Un segundo análisis consistió en un modelo lineal generalizado (MLG), con una estructura de error binomial, con función de ligadura “logit” para datos con errores binomiales 0 y 1 aplicado a las variables explicativas que arrojó el análisis de exploración del árbol de clasificación, con la variable dependiente de presencia/ausencia de triatominos en las viviendas. Para la simplificación del modelo y eliminación de las variables explicativas no significativas se realizó un análisis de varianza.

Para determinar si existían diferencias estadísticas en el infección natural con *T. cruzi* entre temporadas climáticas, así como entre las tres localidades estudiadas, se aplicó un análisis de varianza, tomando por separado a triatominos positivos a tripomastigotes metacíclicos y por otro lado a triatominos positivos a formas microesféricas del parásito. Adicionalmente, se aplicó un anova para probar si existían diferencias en la colecta de triatominos por participación comunitaria a lo largo del muestreo. Todos los datos se analizaron en el programa estadístico R (R Development Core Team, 2010).

Resultados

Entomología

Se colectaron en total 175 triatominos, de los cuales el 88% (152) fue proporcionado por participación de la comunidad y sólo el 12% (21) se obtuvieron mediante inspección activa de viviendas humanas. El 32% (55) fueron hembras, el 32% (56) machos y el 35% (60) ninfas. Además, se colectaron 2 exuvias por inspección en el peridomicilio y 1 en el interior de la vivienda. Cabe destacar que 24 del total de triatominos se colectaron en el ambiente silvestre. Los ejemplares adultos fueron identificados como *Meccus pallidipennis* Stal, 1872 (Fig. 3). La localidad que aportó la mayoría de triatominos fue Rancho La Sandía con 52%, en segundo lugar San Miguel con el 28.5% y finalmente La Noria Chica con 19.5%.

Se colectaron 82 triatominos en la temporada seca-fría, 30 en seca-cálida y 63 en lluvias, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la colecta entre estas temporadas climáticas ($p=3.86e-07$ ***) (Fig. 4).



Figura 3. *Meccus pallidipennis* vector de la EC colectado en la zona de estudio.

Índices entomológicos

Los índices entomológicos calculados para la EC se muestran en el cuadro 4. El 75% de las viviendas de todo el sitio de estudio resultaron estar infestadas, no obstante, la localidad Rancho la Sandía tuvo la tasa de infestación más alta (91.6%), seguida de San Miguel y la Noria Chica (76.9% y 54.5% respectivamente). De igual manera el índice de colonización fue más alto para Rancho la Sandía (41.6%) mientras que La Noria Chica y San Miguel sólo se colectaron ninfas en el 36% y 30% de las viviendas respectivamente. Así mismo el índice de hacinamiento y de densidad (7.8 y 7.1) fue más alto para la localidad Rancho La Sandía.

Índice de infección natural con *T. cruzi*

Para obtener el índice de infección natural con *T. cruzi* se analizaron por observación directa al microscopio (ODM, 40X, Zeiss) las preparaciones con deyecciones de 67 triatominos, de estos, 27 (40.2%) fueron positivos a tripomastigotes metacíclicos (forma infectante). En 57 preparaciones (85%) se detectaron formas microesféricas del parásito. La localidad con el índice de infección natural más alto fue Rancho la Sandía con 56.7%, seguida de la Noria Chica (25%) y de San Miguel (18.18%). Por otro lado, sólo 1 macho de 8 triatominos silvestres analizados presentó *T. cruzi* en su forma flagelada (tripomastigote metacíclico) (Cuadro 1).

El índice de infección natural con *T. cruzi* en su forma flagelada, fue significativamente más alto en la temporada seca-fría (52.2%, $p=1.64e-08$), seguido de la temporada seca-cálida y lluvias (37.5% y 17.8% respectivamente) (Fig. 5).

Por otro lado, el índice de infección natural con *T. cruzi* en formas microesféricas, fue más alto en la temporada seca-fría y seca-cálida (89.7% y 87.5% respectivamente), siendo estas estadísticamente diferentes a la temporada de lluvias ($p=2.8e-11^{***}$), donde el índice de infección natural a microformas del parásito fue más bajo (60.7%) (Fig. 6).

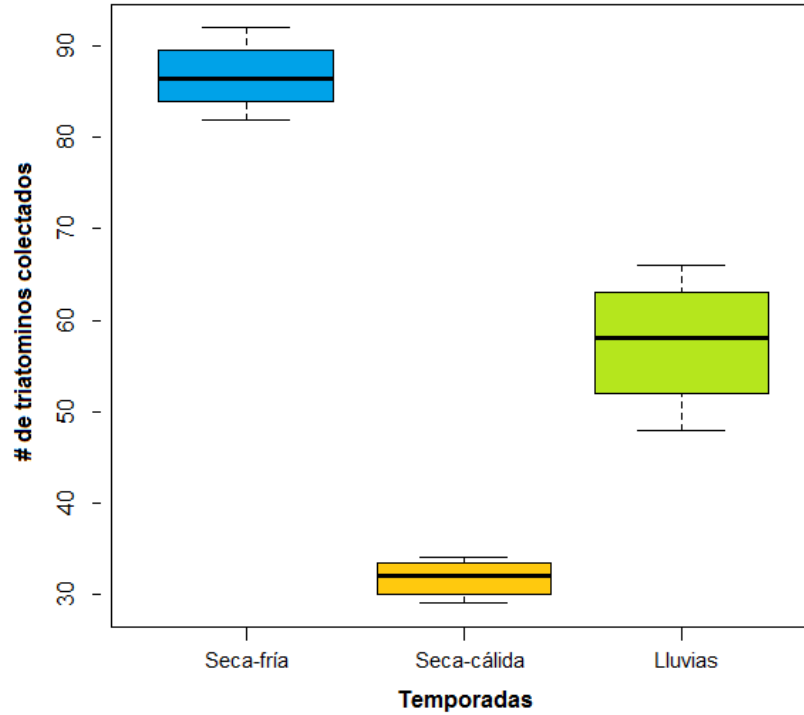


Figura 4. Colecta de triatominos durante tres temporadas climáticas.

Cuadro 1. Índices entomológicos de la enfermedad de Chagas calculados para los triatominos colectados en la zona de estudio.

Índice	Localidades %			Total %
	Rancho la Sandía	La Noria Chica	San Miguel	
IIF	91.6	54.5	76.9	75
ICO	41.6	36.3	30.7	48.1
IHA	7.8	2.5	5	5.5
IDE	7.1	1.3	3.8	4.1
IIN con <i>T. cruzi</i>	56.7	25	18.1	40.2

Índices: IIF: infestación, ICO: colonización, IHA: hacinamiento, IDE: densidad, IIN: infección natural con *T. cruzi*.

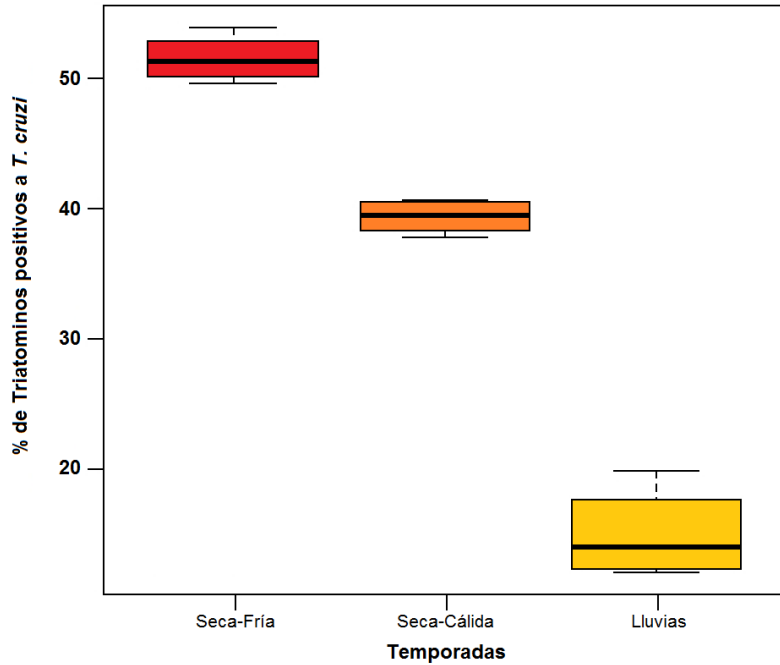


Figura 5. Índice de infección natural con *T. cruzi* en su forma infectante (tripomastigote metacíclico) por temporadas climáticas.

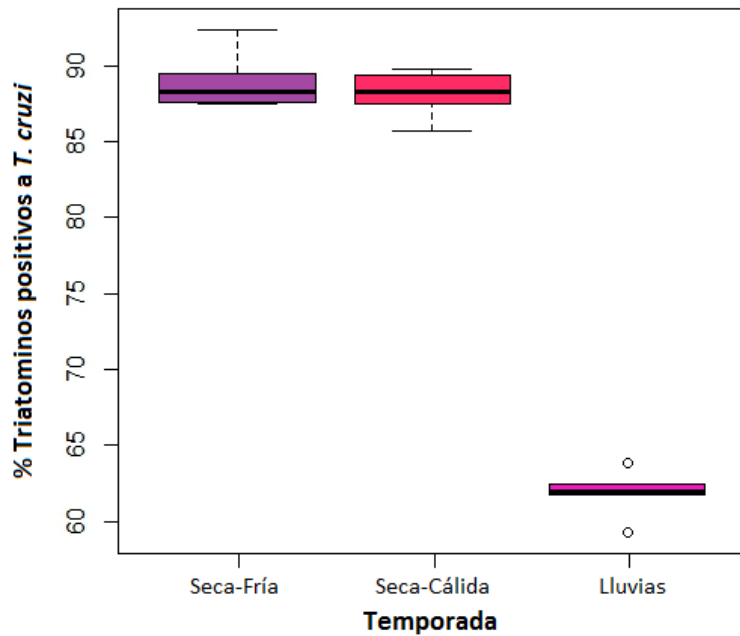


Figura 6. Índice de infección natural con *T. cruzi* en su forma microesférica por temporadas climáticas.

Factores de riesgo ante la infestación domiciliaria

El árbol de clasificación arrojó las variables de localidad, número de ovcaprinos, uso de insecticidas, número de habitaciones y presencia de rocas apiladas en el peridomicilio como los factores de riesgo que propician la infestación domiciliaria por triatominos en las viviendas de la zona de estudio. De acuerdo a este análisis la primera división o “split” se hizo con la variable localidad, que el modelo consideró más adecuada para la partición de datos (Fig. 7). Donde La Noria Chica, presentó viviendas que usan insecticida y por lo tanto no van a estar infestadas. Por el contrario aquellas viviendas en donde no se usa insecticida tienen altas probabilidades de estar infestadas, además si no se usa insecticida y la vivienda tiene más de 3.5 habitaciones la probabilidad de infestación aumenta para esta localidad.

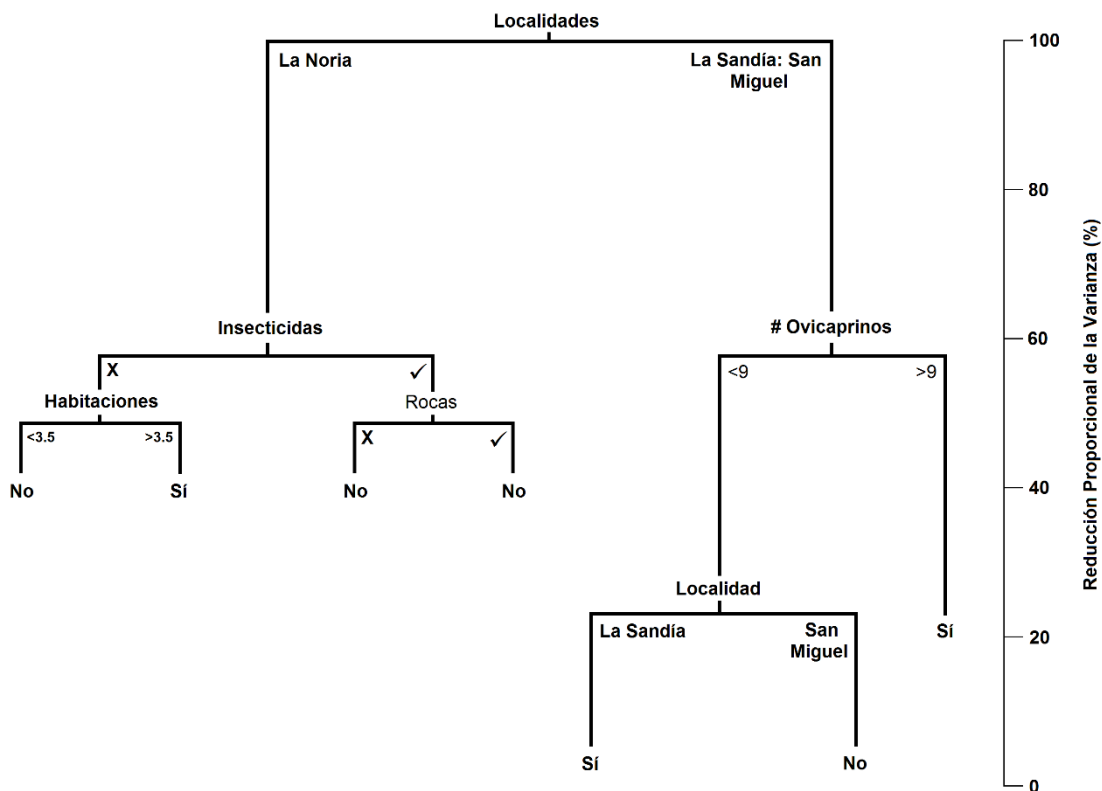


Figura 7. Árbol de clasificación con los factores de riesgo más importantes ante la infestación domiciliaria por triatominos.

Para el caso de las localidades Rancho La Sandía y San Miguel, la ocurrencia de ovicaprinos es el factor principal que explica la presencia de triatominos en el domicilio, en las viviendas de San Miguel donde se tienen más de 9 ovicaprinos por casa la probabilidad de infestación es más alta que aquellos hogares donde el número de estos animales es menor a 9. No obstante, para el caso de Rancho la Sandía, sin importar el número de ovicaprinos, tan sólo la presencia de estos animales aumenta la probabilidad de infestación de las viviendas (Fig. 7).

En la parte analítica, con el modelo lineal generalizado (MLG) se determinaron concretamente los factores de riesgo, así como la interacción entre estos para calcular la variación explicada por cada uno de ellos. El MLG arrojó como variables estadísticamente significativas a las localidades, el número de ovicaprinos, así como la interacción entre localidad con número de ovicaprinos e insecticidas con número de ovicaprinos (Cuadro 2). A pesar de que el número de habitaciones y la presencia de rocas apiladas en el peridomicilio son factores de riesgo de acuerdo al árbol de clasificación, su interacción no es significativa ($p=0.0523$).

Cuadro 2. Modelo lineal generalizado (MLG) de los factores de riesgo ante la infestación domiciliar por triatominos en viviendas rurales de la Mixteca Baja Poblana.

	<i>Df</i>	<i>Devianza</i>	<i>Resid. Df</i>	<i>Resid. Dev</i>	<i>Pr(>Chi)</i>
NULL	NA	NA	51	71.393	NA
Localidades	2	18.5071	49	52.886	9.577e-05 *
# de Ovicaprinos	1	5.9151	46	46.624	0.01501*
Localidad: # de Ovicaprinos	2	19.0134	38	20.798	7.435e-05 *
Insecticidas: # Ovicaprinos	1	4.6735	35	12.079	0.03063 *
Habitaciones: Rocas	1	3.7660	34	8.313	0.05230 °

Códigos de significancia: 0 = *, 0.01=*. No significativo= °, NA= No aplica

De acuerdo a este análisis la variable localidad es la más significativa ($p=9.577e-05$), lo cual concuerda completamente con el árbol de clasificación, donde este factor es la variable con la varianza más alta. Así mismo, la localidad en interacción con el número de ovicaprinos es de significancia importante ($p=7.435e-05$), seguida de número de ovicaprinos ($p=0.01501$) y de insecticidas en interacción con el número de ovicaprinos ($p=0.03063$, Cuadro 2).

Fuentes de alimentación

Se determinaron las fuentes de alimentación de los triatominos mediante amplificación por PCR de la secuencia de citocromo b, a partir de ADN extraído de heces de *Meccus pallidipennis* seguido de ensayos Heterodúplex en gel de poliacrilamida al 10% para comprender la dinámica de alimentación del vector. Se utilizaron como referencia, patrones de Heterodúplex generados de 10 especies de mamíferos: humano, ratón, rata, gato, perro, gallina, conejo, ovicaprino, vaca y caballo (potenciales fuentes de alimentación) usando como driver citocromo b de cerdo (Torres-Montero et. al. 2012, Anexo 6). Las preferencias alimenticias se determinaron por comparación de bandas de Heterodúplex referencia contra bandas de las muestras problema.

Se identificaron 4 fuentes sanguíneas como recursos alimenticios de *M. pallidipennis*, correspondientes a humano, ratón, rata y ovicaprino (Cuadro 3). En la figura 8 se muestran los amplificadores de Heterodúplex formados a partir de las muestras problema, identificándose bandas correspondientes a patrones de humano en 5 carriles, representando la principal fuente de alimentación de los triatominos analizados (62.5%), en tres carriles se identificó alimentación dual: carril 3 humano-ratón, carril 4 humano-ovicaprino y carril 5 humano-rata.

Cabe destacar que en los 5 carriles donde se obtuvieron amplificadores, en todos se identificaron bandas pertenecientes a humano, demostrando que el 100% de los triatominos analizados se alimentaron de personas.

Cuadro 3. Principales fuentes de alimentación sanguínea de *Meccus pallidipennis* de la mixteca baja poblana.

No	Especie	Frecuencia	(%)
1	Humano	50	62.5
2	Ratón	10	12.5
3	Rata	10	12.5
4	Ovicaprino	10	12.5

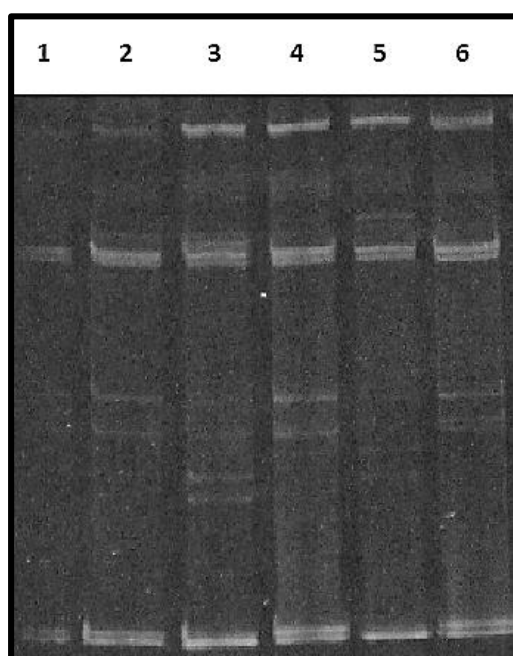


Figura 8. Heterodúplex formados a partir de muestras problema (potenciales fuentes de alimentación). 1: Homodúplex de cerdo (ADN guía), 2: alimentación de humano, 3: alimentación dual humano-ratón, 4: alimentación de humano y banda tenue característica de ovicaprino, 5: alimentación dual de humano-rata, 6 alimentación de humano.

Detección de anticuerpos anti –*Trypanosoma cruzi*

De los 50 sueros analizados, 20 fueron del sexo masculino (40%) y 30 del sexo femenino (60%). El rango de edad fue de 10-74 años y la edad promedio de 33 años. Se detectaron 3 sueros positivos (6%) a través de ambas pruebas de ELISA y en todos los casos se comprobó 2 desviaciones estándar por encima del control positivo. Los casos positivos corresponden a dos personas del sexo femenino y uno del sexo masculino, con edad de 67, 65 y 59 años respectivamente.

Las dos personas del sexo femenino han permanecido toda su vida en la comunidad y manifestaron haber estado en contacto con el vector en algún momento de sus vidas, la persona masculina radicó 5 años en los Estados Unidos de Norteamérica.

Discusión

La participación comunitaria (PC) colectó el 88% del total de organismos a lo largo del muestreo, indicando que las personas mostraron gran disposición para coleccionar triatominos en sus hogares a pesar de ser un primer estudio de esta naturaleza en la región, además la colecta específica de *Meccus pallidipennis* (en sus distintas fases de desarrollo) por los habitantes nos da una idea sobre el fácil reconocimiento de esta especie en la zona de estudio, incluso la mayoría de las personas afirman que el triatomo se introduce durante la noche en las viviendas para la ingesta de sangre, a pesar de ello la comunidad desconocía la importancia médica de este vector como transmisor de *T. cruzi*, de igual manera desconocían la enfermedad de Chagas. La participación comunitaria en la vigilancia entomológica de los vectores de esta enfermedad, involucra a los residentes locales para reportar la presencia de supuestos triatominos en las viviendas (Abad-Franch et. al. 2011). La PC es una forma muy eficiente para la colecta de vectores, muestreos longitudinales basados en la colecta de triatominos por los habitantes de localidades de Jalisco, han reportado a especies como *Meccus longipennis*, *M. pallidipennis*, *M. picturata* y *T. barberi* en viviendas humanas (Frédérique-Brenière et. al. 2010). La localidad Rancho la Sandía aportó más del 50% de triatominos, que las otras dos localidades,

estas diferencias se deben tal vez a la poca participación que detectamos con las localidades de La Noria Chica y San Miguel.

La aplicación profesional de insecticidas es altamente efectiva para el control vectorial de la EC, sin embargo, la reinfestación de viviendas por triatominos nativos es común y muy amplia en toda América Latina, por lo tanto, la detección de triatominos por los habitantes, puede mejorar significativamente la vigilancia entomológica del vector (Abad-Franch et al. 2011), de allí la importancia de trabajar de manera conjunta con la participación de la comunidad.

Con base a la colecta de triatominos en las temporadas climáticas, podemos determinar la dinámica de infestación de las viviendas humanas por el vector con dominancia en la temporada Seca-Fría, seguida de Lluvias y por último la temporada Seca-cálida, las abundancias de *M. pallidipennis* claramente declinaron de Seca-fría a Seca-cálida, a pesar de ello volvieron a incrementar en la temporada de Lluvias. En localidades de Morelos, se ha encontrado el ciclo biológico completo de *M. pallidipennis* en las viviendas, desde huevos hasta adultos (Bautista et. al. 1999), sin embargo en el presente trabajo no se encontraron huevecillos y tampoco ninfas de estadios tempranos en las viviendas inspeccionadas, aunque quizá esto se deba a que los estadios tempranos del vector son menos notables que los estadios tardíos así como los adultos. A pesar del alto índice de colonización del domicilio (48.14%), parecido a lo que Olguín-Salgado et. al. (2016) reportaron para la misma especie en Tecapulco Guerrero (46%), se encontraron adultos, ninfas de estadios tardíos e incluso exuvias, poniendo en evidencia que parte del desarrollo de los triatominos ocurre dentro de algunas viviendas, no obstante podría existir una dispersión de los triatominos de ambientes silvestres a ecotopos domiciliados, debido quizá a la presencia de áreas peridoméstica-silvestres (como viviendas abandonadas) que pueden ser refugios de mamíferos silvestres y por lo tanto se incrementa la colonización por triatominos (Frédérique-Brénière et. al. 2010). Es necesario hacer estudios ecológicos incluyendo poblaciones silvestres para comprender este fenómeno y determinar si existe movimiento de triatominos de ecotopos silvestres a los domiciliarios y viceversa entre las temporadas climáticas.

El índice de infección natural con *T. cruzi* (tripomastigotes metacíclicos) en los triatominos analizados fue de 40.9%, incluyendo todos los estadios de desarrollo, una tasa de infección similar que la reportada para *M. pallidipennis* (44%) en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos (Portugal-García et. al., 2011), donde las características ambientales son muy parecidas a las de la region de la zona de estudio. Encontramos que 65% de las hembras estaban infectadas, seguida de machos con 48% positivos, ambas tasas de infección mucho más altas que en ninfas (9%), esto concuerda con Bautista et. al. (1999) quienes encontraron una tasa de infección más alta en adultos que en ninfas para la misma especie. Esto indica algo muy importante, ya que se colectaron más adultos (115) que ninfas (60) en los ecotopos domiciliarios, incrementando el riesgo de infección por la presencia de vectores adultos en las viviendas.

Entre los triatominos mexicanos *T. barberi* y *T. gerstaeckeri* presentan los índices más altos en algunas localidades (Frédérique-Brenière et. al. 2007 & Molina-Garza et. al. 2007), consideramos a *Meccus pallidipennis* como un vector dentro de ese grupo (Cuadro 4). Por otro lado *T. dimidiata* presenta índices de infección natural relativamente bajos (Sandoval-Ruiz et. al. 2004 & Torres-Montero et. al. 2012).

Cuadro 4. Índice de infección natural con *T. cruzi* en diferentes especies mexicanas de triatominos.

Especie	IIN (%)	Localidad	Referencia
<i>M. pallidipennis</i>	40.9	Acatlán de Osorio, Puebla	En este trabajo
<i>M. pallidipennis</i>	44	Puente Pantitlán, Morelos	Portugal-García et. al. 2011
<i>T. dimidiata</i>	18.4	Jonotla, Puebla	Sandoval-Ruiz et. al. 2004
<i>T. dimidiata</i>	13.7	Región Central de Veracruz	Torres-Montero et. al. 2012
<i>T. barberi</i>	45	Los Guerrero, Jalisco	Frédérique-Brenière et. al. 2007
<i>T. gerstaeckeri</i>	59.7	Nuevo León	Molina-Garza et. al. 2007

Ahora bien, la colecta de los triatominos en ecotopos domésticos, ya sea por participación comunitaria o por inspección activa de viviendas humanas, indica que existe una constante convivencia entre el vector y los habitantes incrementando la posibilidad de infección vía vectorial. No obstante este fenómeno tal vez se vea disminuido por el hecho de que *M. pallidipennis* presenta defecación tardía, con un tiempo de latencia de la defecación (TLD o DLT) de aproximadamente 32 minutos entre el inicio de la alimentación y la primera defecación, y se considera como un mal transmisor de *T. cruzi* debido a su baja capacidad infectiva comparada con otras especies como *T. infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en los países del cono Sur, o *Rhodnius prolixus*, que presentan tiempos de defecación más cortos, 10 y 5 minutos respectivamente (Noguera-Torres et. al. 2000).

Las zarigüeyas (especialmente el género *Didelphis*) son los principales reservorios de *T. cruzi* en varias ciudades, debido a su amplia distribución geográfica, sus poblaciones con altas densidades, su contacto cercano con los triatominos y su amplio rango de biotopos silvestres y domésticos (WHO, 1991). Se ha demostrado que existen diferencias en las prevalencias estacionales de infección por *T. cruzi* en zarigüeyas (*Didelphis albiventris*), que está relacionado a la edad de desarrollo de estos marsupiales, es decir, la prevalencia de infección aumenta con la edad (Schweigmann et. al. 1999). Con respecto a las diferencias en el IIN entre temporadas climáticas es interesante notar que el porcentaje decrece a lo largo del muestreo, la temporada seca-fría tuvo la tasa de infección natural con *T. cruzi* más alta, seguida de seca-cálida y lluvias. Estas diferencias podrían deberse a la conectividad del vector con la infección natural con *T. cruzi* de los hospederos silvestres. Para *Didelphis virginiana* un reservorio sinantrópico, Ruiz-Piña & Cruz-Reyes (2002), reportaron mayor abundancia de individuos infectados en los primeros meses del año, junto con una mayor abundancia de *T. dimidiata* infectados. La temporada Seca-fría tuvo mayor IIN debido tal vez a que los triatominos tienen probabilidades más altas de infección al alimentarse de reservorios silvestres positivos en esos meses, quizá *Didelphis* junto con otros

reservorios silvestres juegan un papel importante en ciclo de transmisión de *T. cruzi* en esta temporada en la región.

Se han reportado varias estrategias para combatir al vector, desde insecticidas hasta el uso de organismos como control biológico, como *Beauveria bassiana*, un hongo entomopatógeno (Zumaquero-Ríos et. al. 2014) o el ácaro ectoparásito *Pimeliaphilus plumifer* (Martínez-Sánchez et. al. 2007) sin embargo el diseño de la estrategia de control vectorial debería de tomar en cuenta la temporalidad y las condiciones locales, en las comunidades estudiadas tal vez sería adecuado implementar un método de control escalonado, atacando al vector con mayor énfasis en la temporada seca-fría, en la cual se colectaron la mayoría de triatomíneos y donde estos tienen la tasa de infección natural con *T. cruzi* más alta.

Factores de Riesgo

Los factores de riesgo ante la infestación domiciliar por triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas parecen variar dependiendo la especie y las características de la región (Cuadro 5). Ramsey et. al. (2005) encontraron como factores más importantes para la infestación de las viviendas humanas por *M pallidipennis* para la región metropolitana de Cuernavaca, Morelos, baja altitud ligada a estatus socioeconómico bajo, el área del jardín mayor a 80m², el acceso libre de perros hacia el intradomicilio, así como la ocurrencia de ardillas y tlacuaches en el peridomicilio. Para la misma especie, Cohen et. al. (2006) encontraron en la localidad de Chalcatzingo, Morelos, la edad de la vivienda, y la ubicación de la vivienda en la ciudad. Para otras especies los factores de riesgo también son diferentes, *T. dimidiata* infesta con mayor probabilidad viviendas construidas con block o madera y que presentan paredes sin revocar en la región central de Veracruz (Sandoval-Ruiz et. al. 2014), y por otro lado viviendas cercanas a la vegetación, con presencia de perros, gallinas y refugios potenciales como pilas de rocas en localidades rurales de la península de Yucatán (Dumonteil et. al. 2013).

Cuadro 5. Factores de Riesgo ante la infestación domiciliar por diferentes especies de triatominos

Especie	Factores de riesgo	Localidad	Referencia
<i>M. pallidipennis</i>	Localidad, # ovicaprinos, uso de insecticidas, # de habitaciones	Acatlán de Osorio, Puebla	Este trabajo
<i>M. pallidipennis</i>	baja altitud ligada a estatus socioeconómico bajo, el área del jardín mayor a 80m ² , el acceso libre de perros hacia el intradomicilio y la ocurrencia de ardillas y tlacuaches en el peridomicilio	Región Metropolitana de Cuernavaca, Morelos	Ramsey et. al. 2015
<i>M. pallidipennis</i>	La edad de la vivienda, y la ubicación de la vivienda en la ciudad	Chalcatzingo, Morelos	Cohen et. al 1999
<i>T. dimidiata</i>	Viviendas con paredes de block y con paredes sin revocar		Sandoval-Ruiz et. al. 2014
<i>T. dimidiata</i>	Viviendas cercanas a la vegetación, con presencia de perros, gallinas y refugios potenciales como pilas de rocas	Comunidades rurales de la península de Yucatán	Dumonteil et. al. 2013

Fuentes de alimentación

Se encontró al humano como principal fuente de alimentación de *M. pallidipennis* en la región de estudio, esto se explica debido a los altos valores de infestación de las tres localidades por este vector, lo cual se ve favorecido por las características de las viviendas que representan factores de riesgo para la sobrevivencia de estos triatomíneos en ecotopos domésticos. Al igual que en este trabajo, Torres-Montero et. al. (2012), reportaron como principal fuente de alimentación de *T. dimidiata* al humano. Existen varios aspectos para determinar la importancia de los triatomíneos como vectores de *T. cruzi*, como la preferencia de recursos sanguíneos, el contacto vector-hombre, la supervivencia del triatomíneo, la densidad de triatomíneos en las instalaciones humanas, el patrón de defecación (Noguera-Torres et. al. 2000). Sin embargo también depende de los hábitats donde los triatomíneos se encuentren, la convivencia del vector y el hombre se manifiesta al encontrar a este último como el recurso de ingesta sanguínea más común.

Para triatomíneos de la especie *M. longipennis* colectados en el peridomicilio en la localidad de Los Guerraes, Jalisco, Bosseno et. al (2006) encontraron como principal fuente de alimentación a la rata (40.5%), seguida de tlacuache (20.3%), también encontraron al humano, aunque en muy baja proporción. Buitrago et. al. (2016) encontraron como recurso más prevalente especies de roedores endémicos y como tercer lugar al humano para *T. infestans* vector más importante de la EC en los países del cono sur. Ramsey, et. al. (2012) encontraron roedores positivos a *T. cruzi* al menos en una temporada, con altos IIN en *Baiomys musculus* y *Neotoma mexicana*, además encontraron al humano como fuente de alimentación para *M. pallidipennis*. Zarate et. al. (1980), reportaron como principales fuentes de alimentación de *T. barberi*, a roedores, humano, gato, perro y bovino.

Como se puede notar los triatomíneos tienen una amplia variedad de recursos sanguíneos que pueden explotar simultáneamente (Cuadro 6), aunque es importante resaltar que como en varias especies, *M. pallidipennis* se alimenta de animales silvestres, peridomésticos, domésticos y del hombre, lo que indica que este vector tiene un potencial muy alto de infectar al hombre debido a que se

alimenta de mamíferos silvestres que mantienen el ciclo zoonótico de la enfermedad en el ambiente silvestre.

Ahora bien, como ya se mencionó, los ovicaprinos representan un factor de riesgo importante para la infestación domiciliaria, a pesar de ello considero que los roedores encuentran sitios adecuados en el peridomicilio y que por lo tanto representan también fuentes de alimentación que finalmente atraen a los triatomos hacia las viviendas donde encuentran al humano como principal recurso.

Cuadro 6. Fuentes de alimentación de algunas especies de triatomos

Especie	Fuente de alimentación	Referencia
<i>M. pallidipennis</i>	Humano, rata, ratón, ovicaprino	En este trabajo
<i>M. longipennis</i>	Rata, tlacuache	Bosseno et. al. 2006
<i>T. dimidiata</i>	Humano, rata, ratón	Torres-Montero et. al. 2012
<i>T. barberi</i>	Dos especies de roedor y humano	Zárate et. al. 1980
<i>T. infestans</i>	Roedor, humano, gato, perro, bovino	Buitrago et. al. 2016

Una dinámica de alimentación similar ocurre con otros grupos de insectos de importancia médica y veterinaria, la determinación de los recursos sanguíneos que representan fuentes de alimentación de los insectos hematófagos, son muy importantes para entender las implicaciones ecológicas en relación a su interacción con reservorios de patógenos para comprender la dinámica de transmisión de enfermedades transmitidas por vector. Existen diversas técnicas con biología molecular para la identificación de fuentes de alimentación de insectos hematófagos, Chena et. al. (2014) estandarizaron la técnica de PCR en combinación con el corte con enzimas y el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del gen mitocondrial citocromo b para identificar los recursos sanguíneos de insectos hematófagos. Sant'Anna et. al. (2008) con la técnica PCR combinada con tecnología de filtros FTA reportaron que *Lutzomyia*

longipalpis (Phlebotominae) colectadas en traspatios usan como fuente de alimentación a gallinas del domicilio. Lee et. al. (2002) utilizaron la técnica de Heterodúplex acoplada a PCR para identificar las fuentes de alimentación de mosquitos (*Culex tarsalis*) y determinaron que se alimentan de varias especies de aves incluyendo una no endémica del Norte de América demostrando la importancia ecológica de reservorios de virus de otras regiones. En otro estudio para identificar fuentes de alimentación de dípteros hematófagos con ensayos Heterodúplex, Boakye et. al (1999) identificaron secuencias de citocromo b pertenecientes a humano como recurso sanguíneo de *Simulium damnosum* (Simuliidae), de puerco doméstico como fuente alimenticia de la mosca tse tse *Glossina palpalis* (Glossinidae). La técnica HDA-PCR puede ser usada entonces para identificar cualquier especie de mamífero que represente un recurso sanguíneo de insectos y podría ayudar a comprender por lo tanto la ecología de insectos hematófagos de importancia médica.

Detección de anticuerpos anti –*Trypanosoma cruzi*

En un trabajo donde se detectaron anticuerpos anti *T. cruzi* en donadores de sangre en el estado de Puebla, que se consideraba como una región no endémica de la EC, Monteón et. al. (2005) notificaron una seroprevalencia estatal de 1.4% y a la Región Mixteca como la zona con más personas positivas a Acs anti *T. cruzi* (2.6%) similar a la región de Tehuacán. En la localidad Puente Pantitlán, Morelos se registró una prevalencia en humanos del 1.2% donde se distribuye *M. pallidipennis*, si bien la localidad está a una altitud más alta y con clima templado (Portugal-García et. al. 2011). De la misma manera, para el municipio de Palmar de Bravo del estado de Puebla, una zona elevada con climas templados a fríos, Sosa-Jurado et. al. (2004), reportaron una prevalencia de 4.3% asociada a vectores como *M. pallidipennis* y *T. barberi*. En el presente trabajo se reporta una prevalencia más alta (6%), esto se debe quizá a que las poblaciones de *M. pallidipennis* se ven favorecidas por los climas secos y calientes típicos de esta región que producen las condiciones idóneas para la sobrevivencia de estos vectores (Sandoval-Ruiz et. al. 2008 & Monteón et. al. 2005). Además es importante señalar que la colecta de *M.*

pallidipennis en ecotopos domésticos revela la convivencia constante y durante todas las temporadas con las personas incrementando el riesgo de infección vía vectorial.

Otro aspecto a considerar es la presencia de animales domésticos reservorios de *T. cruzi*, se han registrado poblaciones de perros con altos porcentajes de seroprevalencia. En Puente Pantitlán, Morelos se notificaron un 24.2% de perros positivos a Acs anti *T. cruzi* asociados a *M. pallidipennis* (Olguin-Salgado et. al. 2016), esto muestra que existe una transmisión activa del parásito de perros positivos a humanos por los vectores. En las localidades estudiadas además de la presencia de ovicaprinos que representan un factor de riesgo ante la infestación domiciliaria, residen perros en la mayoría de las viviendas que si bien no son factor de riesgo al menos en esta región, representan un posible reservorio de *T. cruzi* que debería ser tomado en cuenta en el estudio epidemiológico.

La EC es una de las enfermedades tropicales desatendidas con mayor prevalencia en América Latina. Storino (2000) menciona que -la EC involucra factores de poder político y económico, por lo cual no sólo es una enfermedad de la pobreza, sino que es un paradigma de los mecanismos de ocultamiento y exclusión como forma de discriminación social y laboral-. Esto se ve claramente reflejado en las localidades estudiadas debido a la alta prevalencia registrada, que presentan grados de marginación muy altos y donde los habitantes desconocen la enfermedad de Chagas.

Conclusiones

La participación comunitaria resultó ser una herramienta efectiva para la detección de triatominos en el peridomicilio así como en el intradomicilio.

La mayor abundancia de organismos y el valor más alto en el índice de infección natural con *T. cruzi* se corresponden con la temporada Seca-fría.

Los índices entomológicos calculados fueron altos para la región estudiada, demostrando que *Meccus pallidipennis* tiene una gran capacidad para infestar los ecotopos domésticos.

Existen factores de riesgo que favorecen la sobrevivencia de vectores en ecotopos domésticos que explican en gran medida la dinámica de infestación de viviendas rurales.

La fuente de alimentación más común para los vectores estudiados fue la sangre humana demostrando la constante interacción vector-humano.

Existe una seroprevalencia en los habitantes de las localidades estudiadas.

Anexos

Anexo 1. Índices entomológicos para la enfermedad de Chagas calculados para los triatominos colectados en la zona de estudio (Silveira et. al. 1984; NOM-032, 2014).

Índice	Descripción	Código
Infestación	# de viviendas positivas a triatominos / # de viviendas investigadas x 100	IIF
Colonización	# de viviendas con ninfas / # de viviendas positivas a triatominos x 100	ICO
Hacinamiento	# de triatominos colectados / # de viviendas con triatominos	IHA
Densidad	# de triatominos colectados / # de viviendas investigadas	IDE
Infección Natural con <i>T. cruzi</i>	# de triatominos positivos a <i>T. cruzi</i> / # de triatominos analizados x 100	IIN

Anexo 2. Variables para la encuesta entomológica y socioeconómica sobre factores de riesgo ante la infestación de la vivienda humana por triatominos dirigida a los habitantes de la comunidad del sitio de estudio (Modificado de Dumonteil et. al. 2013 y Sandoval-Ruiz et. al. 2014).

Número	Variable
1	Presencia de gallinas
2	Mantenimiento de las gallinas (corral/libres)
3	Número de gallinas
4	Presencia de perros
5	Número de perros
6	Paredes revocadas
7	Material de construcción de las casas
8	Presencia de leña dentro del hogar
9	Número de personas viviendo en la casa
10	Número de habitaciones

11	Número de camas
12	Material de construcción del piso
13	Uso de insecticidas intradomiciliarios
14	Almacenaje de productos agrícolas dentro del hogar
15	Animales domésticos en el peridomicilio
16	Presencia de rocas apiladas a menos de 10 metros de la casa
17	Presencia de leña a menos de 10 metros del hogar
18	Presencia de ramadas cerca de la casa
19	Presencia de ovicaprinos
20	Número de ovicaprinos
21	Ubicación del corral para ovicaprinos a menos de 10 metros de la casa
22	Presencia de bovinos
23	Número de bovinos
24	Ubicación del corral para bovinos a menos de 10 metros de la casa
25	Cada qué tiempo se hace limpieza del traspatio
26	Conoce a la Chinche (Triatomino)

Anexo 3. Reactivos usados para la extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de heces del vector se realizó con la utilización de los siguientes reactivos

Reactivo	Composición	Concentración
Buffer ACK	NH ₄ Cl	155 Mm
	KHCO ₃	1 mM
	EDTA	0.1 mM
Buffer SE	NaCl	75 Mm
	EDTA	25 Mm, pH=8
Proteinasa K		20 mg/mL
SDS	Dodecil Sódico	10%
Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico		(25:24:1)

Cloroformo/Alcohol Isoamílico	(24:1)
Isopropanol	Absoluto
Etanol	70%
Agua desionizada (H₂O Milli-Q)	

Anexo 4. Reactivos usados para la técnica PCR y electroforesis

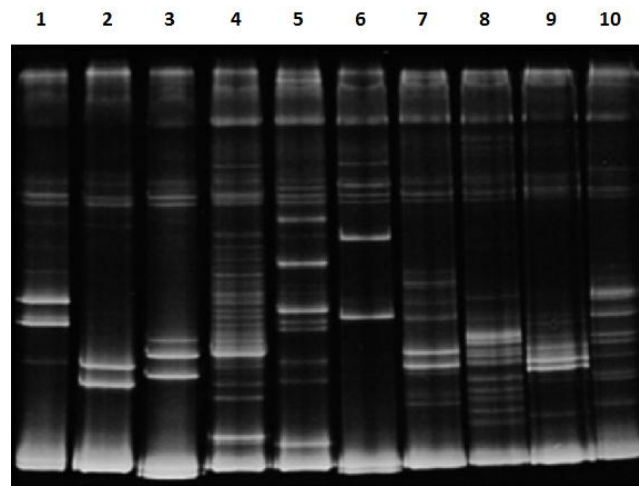
Reactivo	Composición	Concentración
Primer ctc-1	5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	
Primer ctb-2	5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	
Buffer 10X	Tris-HCl	20Mm, pH=7.2
MgCl₂		50 mM
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados	2.5 mM
Taq polimerasa	(Perkin-Elmer)	
Agarosa		1.8%
Amortiguador TAE 1X	Tris-Acetato EDTA	40 mM 1 mM, pH=8.3
Buffer de Muestra Tipo III	Azul de bromofenol, Xinel cianol, glicerol	
Bromuro de etidio		0.5 µg/mL

Anexo 5. Reactivos usados para la técnica Heterodúplex acoplado a PCR (HDA-PCR)

Reactivo	Composición	Concentración
Citocromo b de cerdo	(ADN driver/guía)	
Buffer Muestra DNA 6X	Tris-HCl pH=8, EDTA 60 mM, 0.03% Azul de bromofenol, 0.03% Xinel cianol FF, 60% glicerol	
Amortiguador TBE 1X	Tris-HCl	

	Ácido bórico
	EDTA
Bromuro de Etidio	0.5 µg/mL

Anexo 6. Patrones de Heterodúplex de diferentes especies animales para identificación de fuentes de alimentación de *T. dimidiata* (Torres-Montero et. al. 2012) para comparación de posibles fuentes alimenticias de *M. pallidipennis*.



Heterodúplex para 10 especies de vertebrados: humano (1), ratón (2), rata (3), gato (4), perro (5), gallina (6), conejo (7), borrego (8), vaca (9) y caballo (10), respectivamente.

Anexo 7. Reactivos usados para el ensayo inmunoenzimático ELISA (Chagatest ELISA recombinante v. 4.0., Wiener Laboratorios, 2000).

Reactivo	Descripción
Policubeta sensibilizada	Policubeta de tiras recortables, con 96 pocillos recubiertos con antígenos recombinantes
Diluyente de muestra	Buffer salino con tensioactivo
Conjugado concentrado	Anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (10X)
Diluyente de conjugado	Buffer salino con proteínas
Revelador	Solucion de tetrametilbendicina y peróxido de hidrogeno
Stopper	Ácido sulfúrico 2N

Buffer de lavado concentrado	Buffer salino con tensioactivo (25X)
Control positivo	Suero humano inactivado conteniendo anticuerpos anti <i>T. cruzi</i>
Control negativo	Suero humano no reactivo inactivado

Lista de abreviaturas

ACK: Amortiguador de lisis para eritrocitos

EC: Enfermedad de Chagas

ICO: índice de colonización

IDE: índice de densidad

IHA: índice de hacinamiento

IIF: índice de infestación

IIN: índice de infección natural con *T. cruzi*

mM: milimolar

PBS: Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (Phosphate Buffered Saline), pH=7.4

PC: Participación Comunitaria

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

pmol: Picomoles

SDS: Dodecilsulfatado Sódico

1X: Concentración ideal para ser usada

*****:** Diferencias estadísticamente significativas (*p value =0*)

Bibliografía

Abad-Franch, F., Vega, M. C., Rolón, M. S., Santos, W. S. & Rojas de Arias, A. 2011. Community Participation in Chagas Disease Vector Surveillance: Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 5(6):1-15.

Aché, A. & Berti, J. 1995. Programa de control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. En. Schofield, C. J; J. P. Durjardin & J. Jurberg (Edit). Taller internacional sobre genética poblacional y control de triatominos. Sto. Domingo de los Colorados, Ecuador. 22-29.

Aldana, E., Herendia-Coronado, E., Avendaño-Rangel, F., Lizano, E., Concepción, J. E., Bonfante-Cabarcas, R., Rodríguez-Bonfante, C. & Pulido, M. M. 2011. Análisis morfométrico de *Panstrongylus geniculatus* de Caracas, Venezuela. *Revista Biomédica*. 31(1):108-117.

Alejandre-Aguilar, R., Noguera-Torres, B., Cortez-Jiménez, M., Galvao, C. & Carcaballo, C. 1999. *Triatoma bassolsae* sp. n. do México, com uma chave para as espécies do complexo “*phyllosoma*” (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94(3):353-359.

Bautista, M. L., García de la Torre, G., De Haro-Artega, I. & Salazar-Schettino, P. M. 1999. Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the estate of Morelos, Mexico and possible ecotopes. *Journal of Medical Entomology*. 36(3):233-235.

Boakye D. A., Tang, A., Truc, P., Merriweather, A. & Unnasch, T. R. 1999. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Medical and Veterinary Entomology*. 13(3):282-287.

Bosseno, M. F., Santos-García, L., Baunaure, F., Magallón-Gastélum, E., Soto, Gutierrez, M., Lozan-Kasten, F., Dumonteil, E. & Breniere, S. F. 2006. Short report: identification in triatominae vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi*

variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 74(2):303-305.

Buitrago, R., Bosseno, M. F., Depickere, S., Waleckx, E., Salas, R., Aliaga, C., Barnabé, C. & S. F. 2016. Blood meal sources of wild and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: connectivity between cycles of transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & Vectors*. 9(214):1-10.

Chagas, C. R. J. 1909. Nova tripanosomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1:159-218.

Cohen, J. M., Wilson, M. L., Cruz-Celis, A., Ordoñez, R. & Ramsey, J. M. 2006. Infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) is associated with housing characteristics in rural Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 43(6):1252-1260.

CONEVAL. 2010. Informe anual sobre la situación de pobreza y rezago social. Acatlán, Puebla.

De´Ath, G. & Fabricius K. E. 2000. Classification and regression trees: a power yet simple technique for ecological data analysis. *Ecology*. 81(11):3178-3192.

Dumonteil, E., Nouvellet, P., Rosecrans, K., Ramírez-Sierra, M. J., Gamboa-Leon, R., Cruz-Chan, V., Rosado-Vallado, M. & Gourbière, S. 2013. Eco-bio-social determinants for house infestation by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7(9):1-9.

Frédérique-Brenière, S., Bosseno, M. F., Magallón-Gastélum, E., Soto-Gutiérrez, M. M., Kasten-Monges, M. J., Barraza-Salas, J. H., Romero-Paredes, J. J., & Lozano-Kasten, F. 2010. Community participation and domiciliary occurrence of infected *Meccus longipennis* in two Mexican villages in Jalisco estate. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 83(2):382-387.

Frédérique-Brenière, S., Bosseno, M. F., Magallón-Gastélum, E., Castillo-

Ruvalcaba, E. G., Soto-Gutiérrez, M., Montaña-Luna, E.C., Tejeda-Basulto, J., Mathieu-Daudé, F., Walter, A. & Lozano-Kasten, F. 2007. Peridomestic colonization on *Triatoma longipennis* (Hemiptera: Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco state, Mexico. *Acta Tropica*. 101:249-257.

Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, de la Soledad Lagunes-Castro M, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, México: role of the antigen used for diagnostic. *Paras. & Vectors*. 2015; 8:466-474. doi: 10.1186/s13071-015-1072-2

Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., Sachs, J. D. y Savioli, L. 2007. Control of Neglected Tropical Diseases. *The New England Journal Medicine*. 357(10):1018-1027.

INEGI. 2009. Prontuario de Información Geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Acatlán, Puebla.

Jansen, A. M. & Rodrigues-Roque, A. L. 2010. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. En: Telleria, J. & Tibayrenc, M. (Eds). *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. Elsevier Insights*. London and USA. 251-276.

Lee, J. H., Hassan, H., Hill, G., Cupp, E. W., Higazi, T. B., Mitchell, C. J., Godsey, M. S. & Unnasch, T. R. 2002. Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 66(5):599-604.

Lent H, Wygozinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 163:123-520.

Martínez-Sánchez, A., Camacho, A. D., Quintero-Martínez, M. T. & Alejandre-Aguilar, R. 2007. Effect of ectoparasitic *Pimeliaphilus plumifer* mites (Acari: Pterygosomatidae) on *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) and several other Chagas' disease vectors under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*. 42:139-149.

Molina Garza, Z. J., Rosales-Encina, J. L., Galaviz-Silva, L. & Molina-Garza, D. 2007. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatominos silvestres de Nuevo León, México. *Salud Pública de México*. 49: 37-44.

Monteón, V. M., Reyes-López, P.A., Sosa-Palacio, A., León-Tello, G., Martínez-Murguía, J. & Sosa-Jurado, F. 2005. Distribución heterogénea de la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en Puebla, México. *Salud Pública de México*. 47(2):116-125.

Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., Isita-Tornell, L. & Camacho, A. D. 2000. Defecation pattern in seven species of Triatomines (Insecta: Reduviidae) present in Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42:145-148.

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. 2014. [Consultada el 18 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>

Olguín-Salgado, F. A., Pereyda-Ríos, Y., Pineda, Rodríguez, S. A., Santiago-Dionisio, M. C., Sánchez-Arriaga, J. & Rodríguez-Bataz, E. 2016. Presencia de *Meccus pallidipennis* (Stal, 1872) (Hemiptera: Reduviidae) asociada a infección por *Trypanosoma cruzi* en perros en Tecapulco, Guerrero, México. *Entomología mexicana*. 3:742-747.

Organización Mundial de la Salud. 2016. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Nota descriptiva No. 340. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>

Organización Panamericana de la Salud. 2016. Enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores. Enfermedad de Chagas. [Consultada el 20 de diciembre de 2016]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es

Patterson, J. S., Schofield, C. J., Dujardin, J. P. y Miles, M. A. 2001. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with old world species of *Triatoma*: evidence of new world ancestry. *Medical and Veterinary Entomology*. 15:443- 451.

Portugal-García, C., García-Vázquez, Z., Monteón-Padilla, V., Chávez-López, V., Olamendi-Portugal, M., Ramos, C. 2011. Anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en humanos y perros y presencia del parásito en *Meccus pallidipennis* en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos. *Revista Biomédica*. 22:67-75.

R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. 2010. Disponible en: www.cran.r-project.org

Ramsey, J. M., Alvelar, A. L., Ordoñez, R., Muñoz, G. García, A., López, R. & Leyva, R. 2005. Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*. 19:219–228.

Ramsey, J. M., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Salgado-Ramírez, L., Peterson, T. A., Sánchez-Cordero, V. & Ibarra-Cerdeña, C. L. 2012. Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs and *Triatoma pallidipennis* Hosts in an Anthropogenic Landscape with Endemic Chagas Disease. *PLoS ONE* 7(9):1-11.

Ramsey, J. M., Ordóñez, R., Tello-López, A., Pohls, J. L., Sánchez, V. & Peterson, A. T. Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. En: Ramsey, J. M., Tello-López, A. & Pohls, J. L., eds. 2003. Iniciativa para la vigilancia y control de la enfermedad de Chagas en México. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, México. 85-104.

Ramsey, J. M., Peterson A. T., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazagua, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., Cruz-Félix, K. & Ibarra-Cerdeña, C. N. 2015. Atlas of mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 110(3):339-352.

Rodriguero, M. S. & Gorla, D.E. 2004. Latitudinal gradient in species richness of the new world Triatominae (Triatominae). *Global Ecology and Biogeography*. 13:74-84

Ruiz-Piña, H. A. & Cruz-Reyes, A. 2002. The oposum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of the *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(5):613-620.

Sandoval-Ruiz, C. A., Guevara, R. & Ibáñez.Bernal, S. 2014. Household risk factors associated to infestation of *Triatoma dimidiata*, the Chagas disease vector in Central Region of Veracruz, Mexico. *Salud Pública de México*. 56:213-220.

Sandoval-Ruiz, C. A., Zumaquero-Ríos, J. L., Linares, G., Alejandre-Aguilar, R. Cedillo-Ramírez, M. L. & López-Olguín, J. F. 2004. Infección natural con *Trypanosoma cruzi* en triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectores de la enfermedad de Chagas en San Juan Rayón, Jonotla, Puebla, México. *Tecnociencia*. 6(1):39-47.

Sandoval-Ruiz, C. A., Zumaquero-Ríos, J. L. & Rojas-Soto, R. 2008. Predicting geographic and ecological distributions of triatominae species in the southern Mexican state of Puebla using ecological niche modeling. *Journal of Medical Entomology*. 45(3):540-546.

Sant'Anna, M. R. V., Jones, N. G., Hindley, J. A., Mendes-Sousa, A. F., Dillo, R. J., Cavalcante, R. R., Alexander, B. & Bates, P. A. 2008. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Tropica*. 107:230-237.

Schweigmann, N. J., Pietrokovsky, S., Bottazzi, V., Conti, O., Bujas, M. A. & Wisniwesky-Colli, C. 1999. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en zarigüeyas (*Didelphis albiventris*) en Santiago del Estero, Argentina. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 6(6):371-377

SEDESOL. 2015. Catálogo de localidades del Estado de Puebla. Unidad de Microrregiones. Secretaría de Desarrollo Social. México.

Silveira, A. C., D. F. Rezende & M. H. C. Máximo. 1984. Risk measure of domestic transmission of Chagas disease through a new entomological indicator. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Suppl.* 79:113-115.

Sosa-Jurado, F., Zumaquero-Ríos, J. L., Reyes, P.A., Cruz-García, A., Guzmán-Bracho, C. & Monteón, V. M. 2004. Factores bióticos y abióticos que determinan la seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Palmar de Bravo, Puebla, México. *Salud Pública de México*. 46(1):39-48.

Storino, R. 2000. La cara oculta de la enfermedad de Chagas. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*. 29:31-44.

Torres-Montero J, López-Monteón A, Dumonteil E, Ramos-Ligonio A. 2012. House infestation dynamics and feeding sources of *Triatoma dimidiata* in Central Veracruz, Mexico. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 86(4):677-682.

Wiener Laboratorios S.A.I.C. 2000. Rosario, Argentina, Riobamba 2944. Dir. Téc. Viviana E. Cétola. Producto autorizado A. N. M. A. T. Cert. N°: 6095/07 <http://www.wiener-lab.com.ar>

World Health Organization. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization, 1991; Technical Report Series No. 811.

Zárate, L. G., Zárate, R. J., Tempelis, C. H. & Goldsmith R. S. 1980. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 17(2): 103-116.

Zumaquero-Ríos, J. L., López-Tlacomulco, J. J., Rojas-García, R. & Sansinenea, E. 2014. Lethal effects of a mexican *Beauveria bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal). *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(2):551-557.