

Artículo Original/ Original Article

Técnicas moleculares integradas a la vigilancia entomológica de vectores de la enfermedad de Chagas: Estudio del vector secundario *Triatoma sordida* en la Región Oriental del Paraguay

*Zunilda Sánchez¹, Laura Guillén¹, Daysi Pineda¹, Berta Paredes², *Graciela Russomando¹¹Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay²Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, SENEPA. Asunción, Paraguay**Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:****Sánchez Z, Guillén L, Pineda D, Paredes B, V. de Feltes C, Russomando G.** Técnicas moleculares integradas a la vigilancia entomológica de vectores de la enfermedad de Chagas: Estudio del vector secundario *Triatoma sordida* en la Región Oriental del Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2020; 18(1): 76-83

RESUMEN

Las técnicas moleculares para la detección de infección natural y fuente de alimentación en vectores secundarios de la enfermedad de Chagas cuando son aplicadas a ejemplares capturados en áreas endémicas, históricamente ocupadas por *Triatoma infestans*, proporcionan a las investigaciones epidemiológicas respuestas más exactas con relación a la transmisibilidad de la enfermedad. El presente estudio tiene como objetivo emplear biomarcadores moleculares para evaluar el impacto de la infestación intra y peridomiciliar de *Triatoma sordida* en viviendas bajo vigilancia entomológica de departamentos de la Región Oriental del Paraguay en el período 2007 al 2015. Un total de 559 ejemplares de *T. sordida* capturados en 253, 91 y 52 viviendas de los departamentos Paraguairí, San Pedro y Cordillera, respectivamente fueron analizados. La infestación detectada fue del 24% al 48% así como una elevada colonización intradomiciliar del 5% al 36% en los tres departamentos. La detección molecular de infección natural osciló entre el 14% y 44%; y en 111 ejemplares se determinó la fuente de alimentación. El marcador molecular *citocromo b* permitió demostrar por vez primera un elevado porcentaje de triatomíneos con sangre humana como fuente de alimentación, principalmente en Cordillera con un 82% (28/34 *T. sordida* capturados). Estos hallazgos dejan en evidencia el avance del *T. sordida* en la ocupación del nicho ecológico de *T. cruzi* y la capacidad de esta especie secundaria como vector en la transmisión de *T. cruzi* en comunidades de la Región Oriental.

Palabras clave: *T. sordida*, infección natural, Citocromo B, fuente de alimentación.

Molecular techniques integrated to the entomological surveillance of Chagas disease vectors: Study of the secondary vector *Triatoma sordida* in the Eastern Region of Paraguay

ABSTRACT

When molecular techniques for the detection of natural infection and blood meal source in secondary vectors of Chagas disease are applied to specimens captured in endemic areas, historically occupied by *Triatoma infestans*, provide more accurate answers to questions about transmissibility of the illness and further contribute to the epidemiological studies. The aim of this study was to evaluate the impact of intra and peridomiciliary infestation of *Triatoma sordida* in households from the departments of the

Fecha de recepción: octubre 2019. Fecha de aceptación: noviembre 2019

*Autor correspondiente: Zunilda Sánchez, Graciela Russomando. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, IICS-UNA. San Lorenzo, Paraguay

Correo electrónico: zunysanchez@hotmail.com, russomando.graciela@gmail.com



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons

Eastern Region of Paraguay, under entomological surveillance during the period 2007 to 2015, by using the molecular biomarkers technology. A total of 559 specimens of *T. sordida* captured in 253, 91 and 52 households from Paraguari, San Pedro and Cordillera departments, respectively, were analyzed. The infestation detected was from 24% to 48% as well as a high intradomiciliary colonization from 5% to 36% in the three departments. The molecular detection of natural infections ranged from 14% to 44% and in 111 specimens the meal source was identified. The molecular marker cytochrome b allowed to demonstrate, for the first time, high frequency of triatomines with human blood as a food source, mainly in Cordillera as it was determined in 82% (28/34) of the *T. sordida* captured. These findings demonstrate a progress of *T. sordida* into the ecological niche of *T. cruzi* and the ability of this secondary species as a vector of the transmission of *T. cruzi* in communities from the Eastern Region of Paraguay.

Keywords: *T. sordida*, natural infection, cytochrome B, blood meal source.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, afecta aproximadamente a 6 millones de personas, distribuida en casi toda América Central y Sur. Las manifestaciones clínicas y características epidemiológicas son altamente variables entre una y otra zona endémica⁽¹⁻²⁾. En Paraguay se estima que aproximadamente 150.000 personas estarían infectadas⁽³⁾. Existen áreas históricamente endémicas, como Paraguari y Cordillera de la Región Oriental, donde la seroprevalencia en la década pasada era del 10 al 12% en el grupo etáreo de 15 a 45 años⁽³⁾ y en la Región Occidental o Chaco en las comunidades indígenas las prevalencias estaban por encima del 50%⁽⁴⁾. El principal vector transmisor de la enfermedad de Chagas en la Región del Cono Sur de América ha sido el *Triatoma infestans*⁽⁴⁾, sin embargo, el parásito puede tener como vectores a más de 140 especies de triatominos, y los reservorios incluyen a 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres⁽⁵⁻⁶⁾. El fenómeno básico de la transmisión vectorial del *T. cruzi* al hombre y la adaptación de los triatominos al ecotopo doméstico, más precisamente su domiciliación, dependen de factores tales como su grado de antropofilia, disponibilidad de alimento y condiciones de la vivienda. La transmisión vectorial se lleva a cabo principalmente a través de vectores estrictamente domiciliados. En Paraguay, se ha logrado la eliminación de la transmisión vectorial intradomiciliar por *T. infestans* en la Región Oriental en el año 2008 y se encuentran desde esa fecha bajo vigilancia entomológica, esta situación crea un nicho disponible para *T. sordida* (vector secundario abundante en peridomicilio en áreas rurales)⁽⁷⁾. En reportes previos de nuestro grupo de trabajo, sobre la capacidad vectorial de la especie *T. sordida* provenientes de áreas endémicas de la Región Oriental (año 2005 al 2007) y Occidental (años 2013 al 2015) del Paraguay, ya se describió una elevada colonización e infección natural. En el departamento de Concepción (R. Oriental) la colonización intradomiciliar fue del 44% con una infección natural del 11%⁽⁸⁾; mientras que en el Chaco Paraguayo (R. Occidental) se ha estimado un 87% de riesgo de transmisión de *T. cruzi* intradomiciliar por *T. sordida*⁽⁹⁾. Estos resultados evidencian la capacidad adaptativa de esta especie al domicilio, y un incremento de su potencial vectorial para transmitir la enfermedad de Chagas en áreas del país. Con el fin de ampliar el estudio sobre este vector en otros departamentos, el presente estudio tuvo como objetivo emplear biomarcadores moleculares para evaluar el impacto de la infestación intra y peridomiciliar de *T. sordida* en viviendas bajo vigilancia entomológica de departamentos de la Región Oriental del Paraguay en el periodo 2007 al 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y población: Se analizaron un total de 559 ejemplares de *T. sordida* con datos epidemiológicos como sitio de captura y estadio, distribuidos de la siguiente manera: 335 ejemplares de 253 viviendas de Paraguari, 144 ejemplares de 91 viviendas de San Pedro y 80 ejemplares de 52 viviendas de Cordillera, capturados en el periodo 2007 al 2015 por funcionarios del SENEPA (MSP y BS) y conservados a -20°C. Los triatominos fueron clasificados taxonómicamente según Lent y Wygodzinsky⁽¹⁰⁾ y analizados por microscopía óptica por funcionarios del departamento de Entomología del SENEPA. La captura de los ejemplares en cada vivienda corresponde a una actividad

realizada dentro de la vigilancia entomológica del Programa Nacional de Chagas, en localidades previamente fumigadas por la presencia de *T. infestans* (vector primario).

Disección de triatominos: Se disectó el contenido abdominal de los 559 ejemplares de *T. sordida* colocados en tubo individuales con buffer de lisis compuesto por solución Tris pH 7,4, EDTA, NaCl y SDS⁽⁸⁻⁹⁾.

Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se realizó la incubación de cada tubo con 5 ul de proteinasa K (20 g/mL) a 60°C por 1 hora. La enzima fue inactivada por calentamiento a 95°C por 10 minutos. El ADN fue purificado por el método de extracción: fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al.*⁽¹¹⁾ y precipitación con etanol puro, previa adición de 20µg de gluógeno y acetato de sodio 3M, pH 5,4 en un 10% del volumen recuperado. El pellet de ADN se resuspendió en 100 µL de agua destilada estéril⁽⁸⁻⁹⁾.

Infección natural con *T. cruzi*: La identificación especie específica de *T. cruzi* se realizó por el método PCR empleando como blanco las secuencias repetitivas de ADN nuclear (microsatélites) de *T. cruzi*, con los cebadores TCZ1 y TCZ2 descrito por Moser *et al.* y ADN kinetoplastídico con cebadores 121 y 122⁽¹²⁾. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

Detección de fuente de alimentación: Para la identificación de la fuente de alimentación se empleó como marcador molecular el gen del citocromo b (*Cyt b*), por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa seguida de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP). Para la PCR que amplifica el gen mitocondrial *Cyt b* se utilizaron los cebadores *Cyt b1* y *Cyt b2* y para la RFLP de los productos amplificados se emplearon las enzimas de restricción: *Hae III* y *Mwo I*; descrito por Osnaghi *et al.* y Mota *et al.*⁽¹³⁻¹⁴⁾, que permite la determinación de los patrones de alimentación. El ADN de 4 especies se empleó como controles positivos: humano, ave (gallina), roedor y perro según protocolo descrito por Chena *et al.*⁽¹⁵⁾. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 559 ejemplares de *T. sordida*, provenientes de los departamentos Paraguairí, Cordillera y San Pedro de la Región Oriental capturados en los años 2007 al 2015. En cuanto al lugar de captura y estadio, se observó una infestación intradomiciliar del 28%, 48% y 24% y un índice de colonización (ninfas en el intradomicilio) de 36%, 10% y 5%, en Paraguairí, San Pedro y Cordillera respectivamente. El número de ejemplares capturados en el peridomicilio en los tres departamentos fue mayor que en el domicilio: 241/335 (72%) triatominos en Paraguairí, 75/144 (52%) triatominos en San Pedro y 61/80 (76%) triatominos en Cordillera (Tablas 1A y B).

Tablas 1 A y B: Sitio de captura (Intra/ Peridomiciliar), colonización e infección natural de los 559 ejemplares de *T. sordida* por departamento- Estadios (ninfas: N, adultos: A)

Tabla 1A: Infestación, colonización e infección natural intradomiciliar

Lugar de captura	EJEMPLARES DE <i>T. sordida</i>			
	Total de ejemplares	Infestación (%)	Colonización (%)	Infección natural con <i>T. cruzi</i>
Paraguairí	94 (34N y 60A)	28	36	21 (22%)
San Pedro	69 (7N y 62A)	48	10	8 (12%)
Cordillera	19 (1N y 18A)			7 (37%)
Total	182 (42N y 140A)	24	5	36

N: Ninfas **A:** Adultos. Ninfas en el intradomicilio es indicador de **Colonización**.

Tabla 1B: Infestación, colonización e infección natural en peridomicilio

Lugar de captura	EJEMPLARES DE <i>T. sordida</i>			
	Total de ejemplares	Infestación (%)	Colonización (%)	Infección natural con <i>T. cruzi</i>
Paraguarí	241 (28N/213A)	72	12	41 (17%)
San Pedro	75 (19N/56)	52	25	12 (16%)
Cordillera	61 (13N/48A)	76	21	28 (46%)
Total	377 (60N/317)			81

N: Ninfas A: Adultos. Ninfas en el intradomicilio es indicador de **Colonización**.

Identificación de infección natural con *T. cruzi* por PCR: Se detectó infección natural con *T. cruzi* en 117 de 559 (21%) ejemplares capturados, con un mayor índice de infección en ejemplares de Cordillera 44% (35/80), seguido por Paraguarí 19% (62/335) y San Pedro 14% (20/144). Tablas 1A y B. En la Figura 1 se puede observar los productos de PCR obtenidos con los cebadores 121-122.

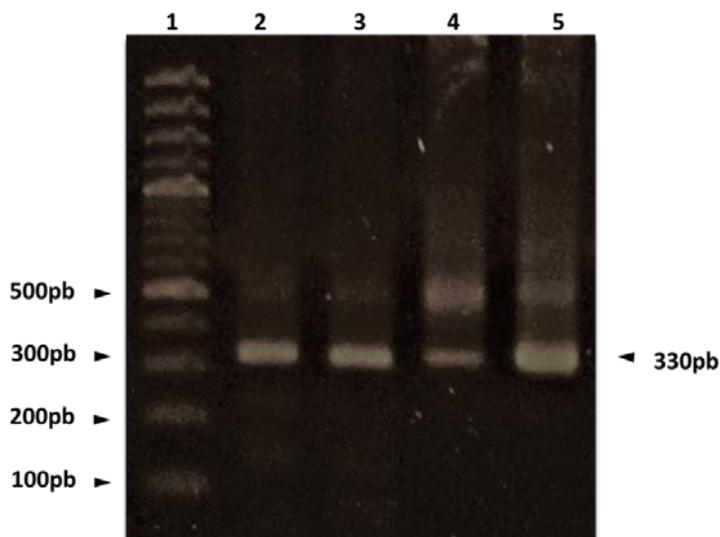


Figura 1: Amplificación de ADN de *T. cruzi* en *T. sordida*. Productos amplificados de ADN de *T. cruzi* en *T. sordida* con los cebadores 121, 122 que arrojan un tamaño de 330 pares de bases (pb). Carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb. Carril 2: control positivo de reacción de PCR equivalente a 100 parásitos. Carriles 3 y 5: muestras de *T. sordida* con *T. cruzi* positivo equivalentes a 100 parásitos. Carril 4: control positivo de reacción equivalente a 10 parásitos.

Fuente de alimentación: Del total de 559 ejemplares analizados, 111 (20%) dieron positivos para el *cyt b*, ver en la Tabla 2. Sangre de roedores/marsupiales fue mayoritaria como fuente de alimentación en Paraguarí 49/67 (73%), mientras que el 80% de los 10 ejemplares positivos de San Pedro contenían en el abdomen sangre de aves. Un elevado porcentaje de triatomos con sangre humana como fuente de alimentación, se detectó en Cordillera en 28 (82%) ejemplares de *T. sordida* de los 34 *cytb* positivos capturados en ese departamento; y 5 de los 7 triatomos infectados con *T. cruzi* y capturados en el intradomicilio se habían alimentado con sangre humana (Tabla 3). En la Figura 2 se pueden observar los amplificados del gen *cyt b* en las muestras de *T. sordida* y en la Figura 3 se observan los patrones de alimentación obtenidos con la enzima *Hae III*.

Tabla 2: Fuentes de alimentación detectadas en 111 ejemplares de *T. sordida*

PCR Gen <i>Cyt b</i>		Patrón detectado por PCR-RFLP			
Procedencia Ejemplares	<i>Cyt b</i> Positivo	Sangre Humana	Sangre de ave	Sangre Roedor Marsupial	Sangre de Perro
Paraguarí	67/335 (20%)	5 (7,5%)	11 (16%)	49 (73%)	2(3%)
San Pedro	10/144 (7%)	1 (10%)	8 (80%)	1 (10%)	-
Cordillera	34/80 (43%)	28 (82%)	6 (82%)		
Total	111/ 559				

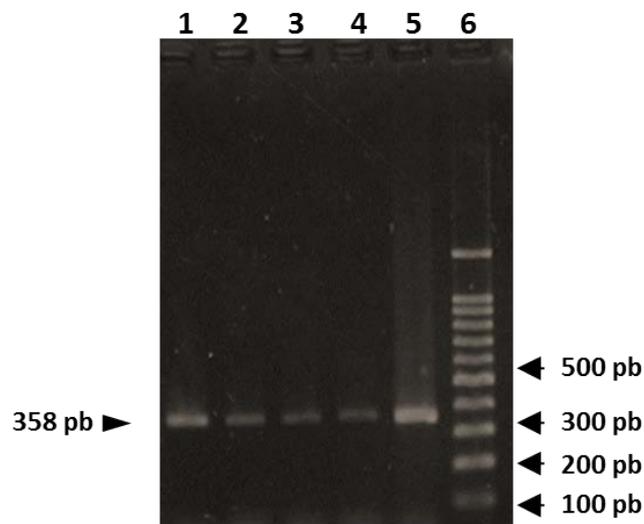


Figura 2: Amplificación del gen *cyt b* en las muestras de *T. sordida*. Carril 1: control positivo ADN de la especie ave (gallina). Carriles 2, 3 y 4: muestras de *T. sordida* *cyt b* positivas. Carril 5: control positivo de ADN humano. Carril 6: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

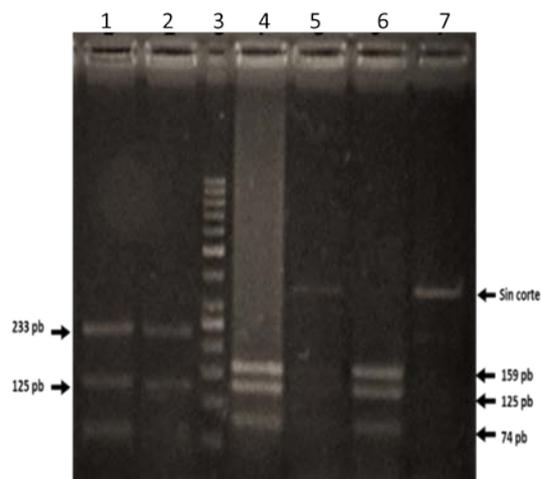


Figura 3: Patrones de alimentación en *T. sordida* con *Hae III*. Carril 1: Control positivo de especie humana con productos de 125 y 233 pb. Carril 2: muestra de *T. sordida* con patrón de sangre humana. Carril 3: Marcador de peso molecular de 50pb. Carril 4: Control positivo de la especie ave (gallina) con productos de 74, 125 y 159 pb. Carriles 5 y 6: muestras de *T. sordida* con patrón de sangre de gallina. Carril 7: producto de *T. sordida* *cyt b* positivo sin corte con *Hae III* con un tamaño de 358 bp.

Tabla 3: Sitio de captura (Intra/ Peridomiciliar) e infección natural asociados a la fuente de alimentación de los 559 ejemplares de *T. sordida* por departamento.

Lugar de captura	INFECCIÓN NATURAL Y FUENTE DE ALIMENTACIÓN INTRA Y PERIDOMICILIAR				
	EJEMPLARES DE <i>T. sordida</i>				Cyt b Total (**)
	Total	Total	Intradom. (*)	Peridom. (*)	
Paraguarí	335	62	31 (1)	31 (4)	67 (73% roedores)
San Pedro	144	20	8 (1)	12	10 (80% aves)
Cordillera	80	35	7 (5)	28 (23)	34 (82% humanos)
Total	559				

(*) **sangre humana.** (**) preferencia alimenticia mayoritaria detectada por la técnica PCR-RFLP aplicada al gen *Cytb* () ejemplares que dieron sangre humana como fuente de alimentación e infección con *T. cruzi* en intra y peridomicilio.

DISCUSIÓN

En este estudio se detectaron una elevada infestación y colonización intradomiciliar de ejemplares de *T. sordida* en las viviendas de tres departamentos de la Región Oriental, además de una frecuencia importante de infección natural con *T. cruzi* y sangre humana como fuente de alimentación. La especie *T. sordida* representa un problema epidemiológico en numerosos países del Cono Sur debido a su amplia valencia ecológica, que se manifiesta en su hallazgo en biotopos silvestres, peridomésticos, así como dentro de la vivienda⁽¹⁶⁾. Se destaca la elevada frecuencia de infección natural con *T. cruzi* en *T. sordida* de los dptos. Paraguarí, San Pedro y Cordillera (19%, 14% y 44%) respectivamente, en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo sobre la capacidad vectorial de la especie *T. sordida* provenientes de áreas endémicas, se reportó en el departamento de Concepción 44% de colonización intradomiciliar y 10,6% de infección natural⁽⁸⁾ y en la Región Occidental en un estudio publicado en el año 2016, realizado con *T. sordida* de los tres departamentos de la región, capturados en los años 2010-2013 se había detectado en 147 viviendas, infestación y colonización en el intradomicilio y peridomiciliar del 8,2% y 53,7% respectivamente, además se estimó un elevado riesgo de transmisión de *T. cruzi* intradomiciliar que fue del 87%⁽⁹⁾. Otro estudio del año 2018 realizado con 220 ejemplares de *T. sordida* capturados en 67 viviendas de 24 localidades del Chaco Paraguayo en los años 2014-2016, se detectó infestación y colonización en el intradomicilio del 19% y 38% y en el peridomicilio 81% y 80%, respectivamente e infección con *T. cruzi* en un 17,3% de los ejemplares analizados⁽¹⁷⁾. En países de la Región del Cono Sur, como en Argentina, existen estudios que reportan desde el 2% hasta el 12% de infección natural en ejemplares de *T. sordida* capturados en el peridomicilio^(18,19).

La densidad de ejemplares de *T. sordida* en el peridomicilio detectada en este estudio fue mayor que en el domicilio, hecho que concuerda con lo reportado en la Región^(18,19) lo que evidencia una adaptación aún fuerte de *T. sordida* al peridomicilio.

En cuanto a la fuente de alimentación detectados en los ejemplares analizados, se destaca la sangre humana como fuente mayoritaria de alimentación en los ejemplares de los tres departamentos en un 7,5%, 10% y 82% respectivamente. En Paraguay ya en 1997 se realizaron estudios sobre las preferencias alimentarias de triatominos con antisueros, uno de ellos realizado con poblaciones domiciliarias y peridomiciliarias de triatominos procedentes de Paraguarí reportó tres fuentes de alimentación más frecuentes: sangre de aves de corral (50,2%), sangre humana (14,7%) y de perro (5,3%), con menor frecuencia se encontró sangre de gato y roedores⁽²⁰⁾. En Brasil ya se habían reportado datos similares en cuanto a hábitos alimenticios de ésta especie de triatolino en regiones de ese país⁽²¹⁾.

Nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios con *T. sordida* en lo referente a fuente de alimentación por el método PCR-RFLP del gen *cyt b* en ejemplares de áreas de las Regiones Oriental y Occidental, en un estudio publicado en el año 2012, sobre un total de

216 ejemplares capturados en el departamento de Concepción, 11 dieron *cyt b* positivos, de los cuales 8 dieron patrón de sangre humana y 1 ejemplar dio sangre de gallina como patrón alimenticio⁽⁸⁾ Un estudio en *T. sordida* de la Región Occidental publicado recientemente detectó la fuente de alimentación en 13 de 220 ejemplares de *T. sordida* analizados (6%), todos resultaron positivos para sangre de gallina y correspondían a captura en el peridomicilio⁽¹⁷⁾.

Se destaca en éste estudio el elevado porcentaje de triatomíneos con sangre humana detectada como fuente de alimentación, en los que también se detectó una frecuencia elevada de infección natural con *T. cruzi* así como infestación y colonización intradomiciliar. Estos resultados evidencian la capacidad adaptativa de esta especie al domicilio, y un incremento de su potencial vectorial para transmitir la enfermedad de Chagas en áreas del país.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Financiación: Este estudio fue financiado por CONACYT, proyecto presentado en la convocatoria 2013.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015; 90(6):33±44.
- Abras A, Ballart C, Llovet T, Roig C, Gutiérrez C, Tebar S et al. Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: A comparative study of simple treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. *PLOS ONE*, 2018; 13(4): 1-14
- Russomando G, Almiron M, Candia N, Franco L, Sánchez Z, de Guillen I. Implementación y evaluación de un sistema localmente sustentable de diagnóstico prenatal que permite detectar casos de transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas del Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(2):49-54
- Rojas de Arias A. Chagas disease in Paraguay. *PAHO/HCP/HCT/72/96.*
- Silveira AC, Rojas de Arias A, Segura E, Guillén G, Russomando G, Schenone H, et al. El control de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una Iniciativa Internacional. 1991/2001. OPAS, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba; 2002. 316.
- Brener Z, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª edición. Brasil: Editorial; Guanabara Koogan. 2000.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (1): 17-30.
- Sánchez León Z, Russomando G, Guillén R. Enfermedad de Chagas: estudio de un vector secundario. Editorial académica española. 2012.
- Sánchez Z, Russomando G, Chena L, Nara E, Cardozo E, Paredes B, Ferreira E. *Triatoma sordida*: indicadores de adaptación y transmisión de *Trypanosoma cruzi* en intradomicilio del Chaco Paraguayo. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2016; 14(3):96-101.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), and the other significanse as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 1979; 163: 123-27.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York E.U.A 1994.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; (7): 1477-82.
- Osnaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H. Analysis of mosquito bloodmeals sing RFLP markers. *Exp. Parasitol.* 2006; 114(4): 259-64
- Mota J, Chacon JC, Gutierrez AF, Sánchez V, Wirtz A, Ordoñez R et al. Identification of blood meal source and Infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas Disease Vectors using a Multiplex *Cytochrome b* Polymerase Chain Reaction, *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 2007; 7(4): 617-27.
- Chena L, Nara E, Sánchez Z, Espinola E, Russomando G. Estandarización de la técnica PCR-RFLP del gen mitocondrial *cyt b* como herramienta para la identificación de fuentes de alimentación de insectos hematófagos. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol 12 (2).* 2014; 33-42.
- World Health Organization. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. *WHO Tech Rep Ser* 2002; 905: 1-109.

17. Sánchez Z, Russomando G, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Villalba de Feltes C. Fuente de alimentación de ejemplares de *Triatoma sordida* en un área con alto riesgo de domiciliación en el Chaco Paraguayo. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2018; 16(1):78-83
18. Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano A, Avalos G, Borda M. Epidemiología de la enfermedad de Chagas, Departamento General Paz, Argentina. RevSaúdePública. 2003; 37(1):59-64.
19. Bar ME, Wisnivesky-Colli C. *Triatoma sordid* Stal 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;(96): 895-9.
20. González N, Gurtler R, Rojas de Arias A, De Marco R, Cousiño B. Feeding sources of domestic triatomines (*Hemiptera-Reduviidae*) in a endemic locality for Chagas disease. Mem IICS Annual Reports.1997
21. Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF, Silvera AC. Hábitos alimentares: infeccao natural e distribuicao de triatomíneos domiciliados na regio central do Brasil. Rev Saúde Públ 1982; 16: 171-204.